Leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen von Proteinen

Eine IR-spektroskopische Untersuchung an Modellsystemen

Wolfgang Kristof

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0016

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen von Proteinen.

- Eine IR-spektroskopische Untersuchung an Modellsystemen -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wolfgang Kristof

München
1979

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Zundel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1977 bis zum Dezember 1979 im Institut für Physikalische Chemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Zundel,
der das Thema dieser Arbeit anregte, möchte ich besonders danken für viele wertvolle Diskussionen und großzügige Unterstützung in vielfacher Hinsicht.
Weiterhin sei an dieser Stelle auch allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Prof. Zundel für interessante Gespräche in einer angenehmen Atmosphäre gedankt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Einleitung	1
1.	Theorie: Die Wasserstoffbrückenbindung –einige grundlegende Anmerkungen–	3
1.1.	Definition und Kriterien für Wasserstoffbrücken	3
1.2.	IR–Absorption und Quantenmechanik	3
1.2.1.	Der Potentialverlauf	3
1.2.2.	Die Anomalie der Polarisierbarkeit	5
1.2.3.	Erklärung der kontinuierlichen Absorption	5
2.	Methodischer Teil	
2.1.	Zusammenstellung der untersuchten Systeme	8
2.1.1.	Strukturunsymmetrische Brücken	8
2.1.2.	Struktursymmetrische Brücken	8
2.2.	Herstellung der Ausgangssubstanzen	
2.2.1.	$(L\text{–}Lys)_n$	8
2.2.2.	$(L\text{–}Cys)_n$	10
2.2.3.	Natriumphenolate	11
2.2.4.	Tetraäthylammoniumhydroxid–Lösung	11
2.3.	Herstellung der Proben	
2.3.1.	Methode der Filmherstellung	11
2.3.2.	Beschreibung der Einzelsysteme	
2.3.2.1.	$(L\text{–}Lys)_n$–Filme	13
2.3.2.2.	$(L\text{–}Lys)_n + HClO_4$–Filme	13
2.3.2.3.	$(L\text{–}Lys)_n$+Chlorphenol–Filme	13
2.3.2.4.	$(L\text{–}Cys)_n$–Filme	16
2.3.2.5.	$(L\text{–}Cys)_n$+N–Base–Filme	16
2.3.2.6.	$(L\text{–}Cys)_n + NEt_4^+OH^-$–Filme	17
2.3.2.7.	$(L\text{–}Glu)_n$ bzw. $(L\text{–}Asp)_n + NEt_4^+OH^-$–Filme	18
2.3.2.8.	$(L\text{–}Cys)_n + (L\text{–}Lys)_n$–1:1–Filme	18
2.3.2.9.	$(L\text{–}Lys)_n + (L\text{–}Tyr)_n$–1:1–Filme	18

Seite

2.3.2.10. Statistische copoly(L-Tyr,L-Lys)$_n$-Filme 19

2.3.2.11. (L-Lys)$_n$+(L-Glu)$_n$-Filme (1:1) 19

2.3.2.12. (L-Glu)$_n$+(L-His)$_n$-Filme (1:1) 19

2.4. Bestimmung des Wassergehaltes von Filmen mit der Adsorptionswaage

2.4.1. Beschreibung der Adsorptionswaage 21

2.4.2. Herstellung von trägerfreien Filmen 22

2.5. Aufnahme der Spektren

2.5.1. Beschreibung der Küvetten 22

2.5.2. Hydratisierung der Filme 23

2.5.3. Trocknung der Filme 23

2.5.4. Registrierung der IR-Spektren 24

2.6. Quantitative Auswertung der Spektren

2.6.1. Ermittlung der Konformation des Rückgrates 25

2.6.2. Ausmaß der Hydratation 26

2.6.3. Grad der Ausbildung von Wasserstoffbrücken 27

2.6.4. Grad des Protontransfers 28

2.6.4.1. am System (L-Lys)$_n$+Chlorphenole 28

2.6.4.2. am System (L-Cys)$_n$+N-Basen 30

2.6.5. Graphische Darstellung der Protontransfer-messungen 32

2.6.6. Auswertung der kontinuierlichen Absorption 33

3. Ergebnisse an strukturunsymmetrischen Wasserstoffbrücken

3.1. Messungen an O-H...N-Brücken-Systemen

3.1.1. (L-Lys)$_n$+Chlorphenole 34

3.1.1.1. Übersicht über die Systeme 34

3.1.1.2. Indizien für vollständige Brückenbildung 35

3.1.1.3. Protontransfergleichgewicht 41

3.1.1.4. Einfluß der Hydratation 45

3.1.1.4.1. bei (L-Lys)$_n$-Filmen 45

3.1.1.4.2. bei (L-Lys)$_n$+Chlorphenol-Filmen 45

3.1.1.5. Konformation des Rückgrates 48

3.1.2. Statistisches Copolymeres copoly(L-Tyr,L-Lys)$_n$-

3.1.2.1. Indizien für Brückenbildung 50

3.1.2.2. Protontransfergleichgewicht 52

3.1.2.3. Einfluß der Hydratation 54

3.1.2.4. Konformation des Rückgrates 55

		Seite
3.1.3.	$(L\text{-Tyr})_n+(L\text{-Lys})_n$ –	57
3.1.3.1.	Indizien für Brückenbildung	58
3.1.3.2.	Protontransfergleichgewicht	59
3.1.3.3.	Einfluß der Hydratation	60
3.1.3.4.	Konformation des Rückgrates	62
3.1.4.	$(L\text{-Glu})_n+(L\text{-Lys})_n$ –	64
3.1.4.1.	Protontransfergleichgewicht	64
3.1.4.2.	Einfluß der Hydratation	65
3.1.4.3.	Konformation des Rückgrates	65
3.1.5.	$(L\text{-Glu})_n+(L\text{-His})_n$ –	67
3.1.5.1.	Indizien für Brückenbildung	67
3.1.5.2.	Protontransfergleichgewicht	68
3.1.5.3.	Einfluß der Hydratation	69
3.1.5.4.	Konformation des Rückgrates	71
3.2.	Messungen an S-H...N-Brücken-Systemen	
3.2.1.	$(L\text{-Cys})_n$+N-Basen	73
3.2.1.1.	Übersicht über die Systeme	73
3.2.1.2.	Indizien für Brückenbildung	74
3.2.1.3.	Protontransfergleichgewicht	80
3.2.1.4.	Polarisierbarkeit und kontinuierliche Absorption	82
3.2.1.5.	Einfluß der Hydratation	84
3.2.1.6.	Konformation des Rückgrates	85
3.2.1.7.	Zusammenhang zwischen Protontransfer und Konformationsänderung	86
3.2.2.	$(L\text{-Cys})_n+(L\text{-Lys})_n$ –	87
3.2.2.1.	Indizien für Brückenbildung	87
3.2.2.2.	Protontransfergleichgewicht	88
3.2.2.2.1.	Die zur Auswertung herangezogene Bande	88
3.2.2.2.2.	Ermittlung des Protontransfers mit Hilfe dieser Bande	91
3.2.2.3.	Kontinuierliche Absorption	92
3.2.2.4.	Einfluß der Hydratation	93
3.2.2.5.	Konformation des Rückgrates	94
3.2.2.5.1.	mit kurzkettigem $(L\text{-Lys})_n$	94
3.2.2.5.2.	mit langkettigem $(L\text{-Lys})_n$	95

		Seite
4.	Ergebnisse an strukturasymmetrischen Wasserstoffbrücken	97
4.1.	Poly-L-Lysin-Semiperchlorat	98
4.1.1.	Kontinuierliche Absorption als Kriterium für $(NHN)^+$-Brückenbildung	98
4.1.2.	Prozentsatz an ausgebildeten Brücken	100
4.1.3.	Abhängigkeit der Brückenbildung von der Hydratation	101
4.1.4.	Konformation des Rückgrates	103
4.2.	Poly-L-Cystein-Semi-tetraäthylammoniumsalz	103
4.2.1.	Kontinuierliche Absorption	103
4.2.1.1.	als Indikator für $(SHS)^-$-Brückenbildung	103
4.2.1.2.	Zusammenhang zwischen kontinuierlicher Absorption und Prozentsatz an ausgebildeten Brücken	105
4.2.2.	Zusammenhang zwischen Brückenbildung und Konformation des Rückgrates	109
4.2.2.1.	Die hohe Kooperativität der Konformationsänderung	109
4.2.2.2.	Der verschobene Maximalwert der kontinuierlichen Absorption	111
4.2.3.	Abhängigkeit der Brückenbildung von der Hydratation	112
4.3.	Poly-L-Glutaminsäure-Semi-tetraäthylammoniumsalz	114
4.3.1.	Kriterien für die Ausbildung von $(OHO)^-$-Brücken	114
4.3.1.1.	Kontinuierliche Absorption	114
4.3.1.2.	Lage der antisymmetrischen Carboxylatbande	117
4.3.2.	Einfluß der Hydratation	119
4.3.3.	Konformationsänderung des Rückgrates	120
4.3.4.	Zusammenhang zwischen Brückenbildung und Konformation des Rückgrates	122
4.4.	Poly-L-Asparaginsäure-Semi-tetraäthylammoniumsalz	123
4.4.1.	Nichtexistenz von $(OHO)^-$-Brücken	123
4.4.2.	Gründe für die Nichtexistenz	124
5.	Bedeutung der Ergebnisse hinsichtlich biologischer Systeme	
5.1.	Lage des Protontransfergleichgewichtes	125
5.2.	Einfluß von Wasser auf Dissoziation d.Brücken	128
5.3.	Konformationsänderungen	130
	Zusammenfassung der Ergebnisse	132

Einleitung :

- Vorkommen von leicht polarisierbaren Wasserstoffbrückenbindungen in biologischen Systemen :

Neben der großen Bedeutung von Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen auf dem Sektor der Chemie kleiner Moleküle vorzugsweise in fester und flüssiger Phase sind derartige Wechselwirkungen von besonderer Relevanz in biologischen Systemen und insbesondere bei Makromolekülen.
Erinnert sei in diesem Zusammenhang nur an die Basenpaarung in der DNA und an die Ausbildung geordneter Sekundärstrukturen im Rückgrat von Proteinen, beides Phänomene, die mit dem Konzept der Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden.(Lit.102, 103)
Daneben spielen aber leicht polarisierbare und zumindest annähernd symmetrische Wasserstoffbrücken auch für die Wechselwirkungen der Seitengruppen polarer Aminosäuren in Proteinen eine wesentliche Rolle, so z.B. im aktiven Zentrum vieler Enzyme, in deren Mechanismen oftmals Protonenshifts über derartige Brücken formuliert werden.
Als Beispiele seien hier nur Asparaginsäure-Histidin-Brücken in Chymotrypsin(Lit.89) und BPN'-Subtilisin(Lit.37) einerseits,und Cystein-N-Base-Brücken in Alkoholdehydrogenase(Lit.95) und Fettsäuresynthetase(Lit.94) andererseits aufgezählt.

Weiterhin können stark polare Proton-Transfer-Wasserstoffbrücken, wie sie in über H-Brücken gebundenen Ionenpaaren zwischen Lysin- bzw. Arginin-und Asparaginsäure- bzw. Glutaminsäureresten auftreten, durch ihre großen Dipole (um 10 Debye) für ein Protein stark strukturstabilisierend wirken, wie z.B. im Falle des Thermolysins(Lit.41) oder bei der Stabilisierung der T-Konformation von Hämoglobin. (Lit. 49)

Aber nicht nur derartige strukturunsymmetrische Wasserstoffbrücken des Typs $A\text{-}H\ldots B \rightleftharpoons A^{-}\ldots H\text{-}B^{+}$ wurden in Proteinen beobachtet, sondern auch struktursymmetrische der Art $(AHA)^{-}$ und $(BHB)^{+}$.
So fand Hsu(Lit.39, 40) im aktiven Zentrum einer sauren Protease eine struktursymmetrische anionische Brücke$(AspHAsp)^{-}$ zwischen zwei Asparaginsäureresten, während Fruton (Lit.55) ebenfalls den Mechanismus saurer Proteasen über eine derartige Carbonsäure-Carboxylat-Brücke formulierte.

Eine $(NHN)^+$-Brücke zwischen zwei Histidin-Resten befindet sich im aktiven Zentrum von RNase A , wie Rüterjans fand.(Lit.105, 106)

Schließlich ist am Beispiel des Hämoglobin (Lit.49) aus dem Übergang zwischen R- und T-Form ersichtlich, wie Konformationsänderungen und Ausbildung bzw. Öffnung von Wasserstoffbrücken miteinander korelliert sein können. Auf derartige Zusammenhänge wieß auch Vinogradov hin. (Lit.1)
Wechselseitige Abhängigkeit zwischen Ausbildung von Wasserstoffbrükken, Konformation und Hydratation, wie sie von Zundel und Lindemann (Lit.11) am Modellsystem $(L\text{-His})_n$+Essigsäure gezeigt wurde, scheint auch bei nativen Protein eine Rolle zu spielen.
So wird z.B. die Substratspezifität von Aminoacyl-t-RNA-Synthetase auf derartige Weise diskutiert.(Lit.107)

Aus dieser Auswahl von Beispielen ist die große Bedeutung von Wasserstoffbrücken in biologischen Systemen ersichtlich, und es lag deshalb nahe, die spezifischen Eigenschaften einer möglichst großen Vielfalt derartiger Brücken im Detail zu untersuchen.

Hierzu bot sich die IR-spektroskopische Untersuchung von lösungsmittelfreien Polyaminosäurefilmen an, die im 1:1-Verhältnis mit Wasserstoffbrücken ausbildenden Partnern versetzt wurden.
Derartige Untersuchungen existieren bereits für die strukturunsymmetrischen Systeme $(L\text{-Glu})_n$+ N-Basen (Lit.5), $(L\text{-His})_n$+ Carbonsäuren (Lit.11) und für die strukturunsymmetrische $(NHN)^+$-Brücke bei Poly-Histidin-Semi-hydrochlorid.(Lit.20,51)
In der vorliegenden Arbeit erwies sich die IR-Spektroskopie als gut geeignete Methode, da sie bei einer großen Anzahl von Systemen erlaubte, Konformation des Rückgrates, Grad der Ausbildung von Wasserstoffbrücken und Höhe des Protontransfers in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad zu bestimmen.
Weiterhin war es in den meisten Fällen möglich, aus dem Auftreten einer kontinuierlichen Absorption (Lit.50) Aussagen über die Polarisierbarkeit der jeweiligen Brücke zu machen und aus der wellenzahlabhängigen Verteilung der Absorption qualitative Schlüsse auf die Brückenlänge zu ziehen.(Lit.29)
Die an den verschiedenen Brückensystemen erhaltenen Ergebnisse gestatteten es schließlich, einige Überlegungen zu Mechanismen im aktiven Zentrum von Enzymen und insbesondere zum Protonenleitungsmechanismus im Bakteriorhodopsin anzustellen.

1. Theorie : Die Wasserstoffbrückenbindung - einige grundlegende Anmerkungen :

1.1. Definition und Kriterien für Wasserstoffbrückenbindung :

Als Wasserstoffbrückenbindung wird die Wechselwirkung zwischen einer Protondonorgruppe AH und einer Protonacceptorgruppe B definiert, wenn die tatsächliche Komplexbildungsenergie größer als der durch Dispersionswechselwirkungen zu erwartende Energiebetrag ist. (Lit.108)
Mit Sicherheit kann auf die Existenz einer Wasserstoffbrücke geschlossen werden, wenn
1) der gemessene Bindungsabstand d_{H-B} kleiner als die Summe der van der Waals-Radien ist, und
2) die potentielle Energie des an A gebundenen Protons durch die Natur der Acceptorgruppe beeinflußt wird.(Lit.109)

Neben der Coulomb-Wechselwirkung geladener Teilchen, den Induktionswechselwirkungen und den Dispersionskräften gehört die Wasserstoffbrückenbindung üblicherweise zu den schwachen zwischenmolekularen Wechselwirkungen, deren Bindungsenergie unterhalb von ca.15 Kcal/Mol liegt.
Daneben gibt es jedoch auch weit kräftigere Wasserstoffbrücken, wie z.B. im $H_5O_2^+$, dessen Bindungsenergie etwa 25 Kcal/Mol beträgt.(Lit.111)
Ein Charakteristikum der Wasserstoffbrückenbindung ist die räumliche Restriktion, d.h., die energetische Begünstigung einer zumindest annähernd linearen Anordnung der Gruppierung A-H...B.
Jedoch nimmt die Bindungsenergie bei nicht zu großer Abwinkelung zunächst nur relativ langsam ab(Lit.110), was für die Flexibilität biologischer Makromoleküle von wesentlicher Bedeutung ist.

1.2. IR-Absorption und Quantenmechanik von Wasserstoffbrückenbindungen:

1.2.1. Der Potentialverlauf :

Das in einer Wasserstoffbrücke befindliche Proton ist in einem Potential, dessen Verlauf durch die Art der Umgebung festgelegt ist. Prinzipiell sind vier verschiedene Typen von Potentialverläufen denkbar :

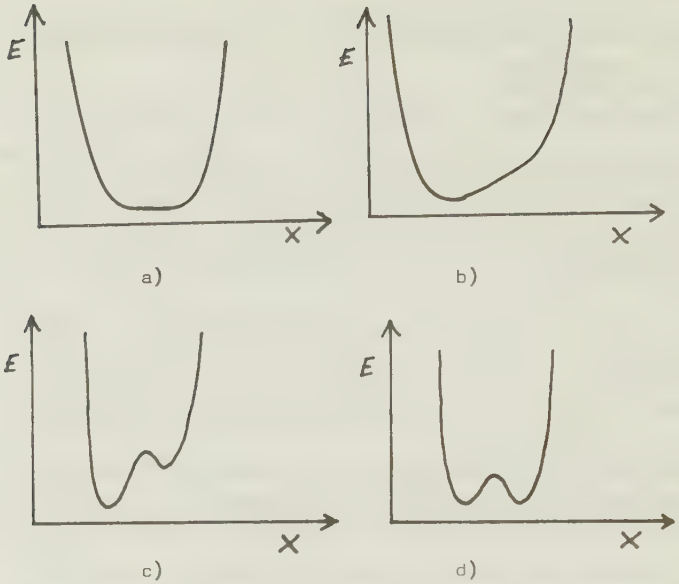


Abbildung 1.1.: Verschiedene mögliche Potentiale des Protons in der Wasserstoffbrücke

Von den in Abbildung 1.1. gezeigten Potentialverläufen führen b), c) und d) zu einer starken Polarisierbarkeit der Brücke.
Dies sei am Beispiel eines symmetrischen Doppelminimumpotentials (d) wie es z.B. im $H_5O_2^+$ vorliegt, gezeigt.(Lit.50)

Die Lösung der Schrödinger-Gleichung mit einer derartigen Kurve potentieller Energie liefert für das Proton einen Satz von Energieeigenwerten, von denen die vier tiefsten Niveaus in Abbildung 1.2. eingezeichnet sind.

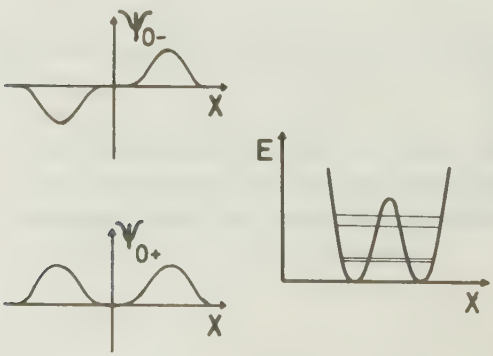


Abbildung 1.2. :
Doppelminimumpotential mit den 4 untersten Eigenwerten.
Den beiden untersten Eigenwerten zugehörige Eigenfunktionen.

Weiterhin zeigt Abbildung 1.2. die den beiden untersten Energieniveaus zugehörigen Eigenfunktionen.

1.2.2. Die Anomalie der Polarisierbarkeit :

Sowohl ψ_{o+} als auch ψ_{o-} repräsentieren symmetrische Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für das Proton.
Bereits bei Anwesenheit eines kleinen elektrischen äußeren Feldes mischen sich diese Funktionen, da bei Potentialen dieser Art der Abstand der untersten Niveaus relativ klein ist. Dies führt zu einer unsymmetrischen Wellenfunktion mit einer Unsymmetrie der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Protons.
Diese Unsymmetrie der Ladungsverteilung ist aber die Ursache der großen Polarisierbarkeit der Wasserstoffbrücke, welche bis zu drei Größenordnungen über dem Wert von Elektronenpolarisierbarkeiten liegt.(Lit.112, 113)

1.2.3. Erklärung der kontinuierlichen Absorption :

Abbildung 1.3. zeigt, daß durch Einwirkung eines äußeren elektrischen Feldes die Symmetrie des Potentialverlaufes empfindlich gestört wird, und damit sich der Abstand zwischen den Energieniveaus verändert.

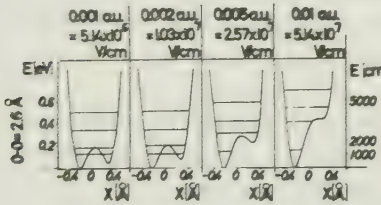


Abbildung 1.3. :
Doppelminimumpotential bei Einwirkung eines äußeren Feldes.
(nach Lit. 50)

In Abbildung 1.4. schließlich sind die Energieniveaus des Protons in Abhängigkeit vom Feld bei zusätzlicher Berücksichtigung der Brücken-Valenzschwingung gezeigt. Man sieht, daß sich die Niveaus durch die Verschiebung unter dem Einfluß des elektrischen Feldes sehr häufig nahekommen, was zu einer großen Zahl von Resonanzen führt und damit ebenfalls für die Entstehung des Kontinuums von entscheidender Bedeutung ist.

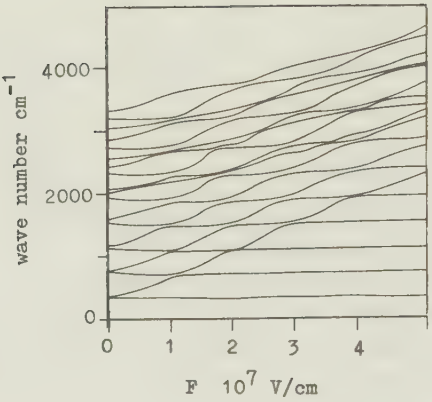


Abbildung 1.4. : Abhängigkeit der Energieniveaus vom äußeren elektrischen Feld (nach Lit. 115)

Bei Vorliegen einer statistischen Verteilung von elektrischen Feldern um die betreffende Wasserstoffbrücke sollte demnach eine kontinuierliche Verteilung von Energieniveaus vorliegen und somit eine kontinuierliche Absorption zu beobachten sein, wie dies auch experimentell an einer großen Anzahl von Komplexen gezeigt wurde.(Lit.50)

In realen Systemen wird die statistische Verteilung von elektrischen Feldern durch die Anwesenheit verschiedener, mit der Wasserstoffbrücke wechselwirkender Nachbargruppen repräsentiert.
Hierbei sind vor allem drei Arten von Wechselwirkungen zwischen Umgebung und Wasserstoffbrücke in Betracht zu ziehen.

1) Induktionswechselwirkungen :

Die erwähnte hohe Polarisierbarkeit von Wasserstoffbrücken ermöglicht besonders kräftige Wechselwirkungen mit in der Umgebung befindlichen Dipolmolekülen oder ionischen Spezies.

2) Protonen-Dispersionskräfte :

Die leicht polarisierbaren Wasserstoffbrücken können nach Art der van der Waals-Kräfte untereinander wechselwirken. Dabei hängt die Wechselwirkungsenergie natürlich vom Abstand und der räumlichen Anordnung der beteiligten Wasserstoffbrücken ab.
Während für ungeladene Brücken dieser Effekt vermutlich von großer Bedeutung ist, kann er bei geladenen Systemen vernachlässigt werden, da in diesem Fall die Potentiale durch die vorliegenden Induktionswechselwirkungen bereits relativ unsymmetrisch sind.

3) Kopplung der Protonenübergänge in der Brücke mit zwischenmolekularen Schwingungen :

Hierfür kommt vor allem die Kopplung mit der Wasserstoffbrücken-Valenzschwingung in Frage. Daneben sind auch noch Kopplungen mit anderen Schwingungen im Bereich kleiner Wellenzahlen denkbar.

Neben diesen Wechselwirkungseffekten wird die Verteilung der Energieniveaus noch zusätzlich durch eine statistische Streuung der Gleichgewichts-Brückenlängen verbreitert.

Kontinuierliche Absorption bei strukturunsymmetrischen Brücken :

Nicht nur bei Wasserstoffbrücken vom struktursymmetrischen Typ $(AHA)^-$ bzw. $(BHB)^+$, sondern auch bei solchen vom strukturunsymmetrischen Typ (A-H...B) wurde das Auftreten kontinuierlicher Absorption beobachtet.(Lit.12, 73, 114)
Das Maximum der Intensität der kontinuierlichen Absorption findet sich bei geeigneten Donor-Acceptor-Kombinationen, die einen Protontransfer von 50 % ermöglichen, d.h.,wo den beiden Grenzstrukturen $A\text{-}H...B \rightleftharpoons A^-...H\text{-}B^+$ gleiches Gewicht zukommt,und dementsprechend weitgehend symmetrische Doppelminimumpotentiale vorliegen.

2. Methodischer Teil :

2.1. Zusammenstellung der untersuchten Systeme :

2.1.1. Strukturunsymmetrische Wasserstoffbrücken :

- Polymer - Monomer - Systeme :

  $(L\text{-Lys})_n$ + Chlorphenole

  $(L\text{-Cys})_n$ + N-Basen

- Polymer - Polymer - Systeme :

  $(L\text{-Tyr})_n + (L\text{-Lys})_n$

  Copoly$(L\text{-Tyr},L\text{-Lys})_n$

  $(L\text{-Cys})_n + (L\text{-Lys})_n$

  $(L\text{-Glu})_n + (L\text{-Lys})_n$

  $(L\text{-Glu})_n + (L\text{-His})_n$

2.1.2. Struktursymmetrische Wasserstoffbrücken :

- Polymer - Polymer - Systeme :

  $(L\text{-Lys-H-Lys})_n^+$

  $(L\text{-Cys-H-Cys})_n^-$

  $(L\text{-Glu-H-Glu})_n^-$

  $(L\text{-Asp-H-Asp})_n^-$

2.2. Herstellung der Ausgangssubstanzen :

2.2.1. Poly-L-Lysin $(L\text{-Lys})_n$:

$(L\text{-Lys})_n$ wurde in Form des Hydrochlorids oder -Bromids von MILES-Biochemicals, Rehovot, und Sigma-Chemie, München, in verschiedenen Kettenlängen zwischen n = 60 und n = 2286 bezogen.
Zur Herstellung der freien Poly-Base erwies sich die Verwendung eines stark basischen Anionenaustauschers mit großer Korngröße als vorteilhaft. (Merck Lewatit MP 5080; 60-150 mesh ASTM)
Die große Korngröße ermöglichte dabei auch den schnellen Durchfluss von hochviskosen Lösungen langkettiger Polymerer.

In einer mit Hilfe von KOH-Plätzchen CO_2-frei gemachten Glove-Box wurde eine Austauschersäule von 10 cm Höhe und 1 cm Durchmesser zunächst mit 1n, mittels $Ba(OH)_2$ carbonatfreier Natronlauge Cl^--frei gewaschen und anschließend mit frisch destilliertem Wasser bis pH_6 nachgewaschen.

Bei einer typischen Umsetzung beschickte man die auf diese Weise vorbehandelte Säule mit 10 ml einer wässrigen Lösung von $(L\text{-Lys HBr})_n$ der Konzentration 30 - 35 µÄquivalente/ml.(bezogen auf ε-Aminogruppen)

Das erhaltene Halogenid-freie Eluat besaß pH-Werte um 11,1 und die durch potentiometrische Titration bestimmte Konzentration an freien basischen Aminogruppen lag je nach Versuch zwischen 18 und 25 µÄquivalente/ml.

Die Ausbeute entsprach je nach Ansatz 70-80 % d.Theorie.

Die erhaltene wässrige Lösung des Polymeren konnte dann direkt zur Herstellung von $(L\text{-Lys})_n$-Filmen verwendet werden.

Die $(L\text{-Lys})_n$-Lösung wurde in zweierlei Hinsicht überprüft :

1) Der pK_a-Wert der ε-Aminogruppen wurde nach einem von Katchalski (Lit.38) beschriebenen Verfahren mit Hilfe einer Titration bei konstanter Ionenstärke zu 10,5 $\pm$ 0,1 bestimmt.

Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem von Katchalski erhaltenen Wert (Lit.38) von 10,44.

2) Unter stark alkalischen Bedingungen, wie sie ja auch beim oben beschriebenen Austauschvorgang vorliegen, kann bei Polypeptiden bekanntlich sowohl Racemisierung als auch Kettenspaltung eintreten. (Lit.67) So wurde z.B. die Kinetik der Racemisierung von $(L\text{-Ser})_n$ in wässriger LiOH-Lösung mit Hilfe von ORD-Messungen bestimmt. (Lit.116)

Da die spezifische Drehung von Polyaminosäuren stark von Konformation, Kettenlänge und Racemisierungsgrad abhängt,(Lit.117) liefert die Bestimmung dieser Größe vor und nach dem Ionenaustausch einen Anhaltspunkt über die Unversehrtheit der Probe.

Deshalb wurde zunächst die spezifische Drehung $[\alpha]_D$ einer wässrigen $(L\text{-Lys HBr})_n$-Lösung der Kettenlänge n = 192 bestimmt, dann der Ionenaustausch durchgeführt und anschließend wiederum $[\alpha]_D$ des mit der äquivalenten HCl-Menge neutralisierten basischen Eluates bestimmt.

In beiden Fällen lag der Wert für $[\alpha]_D$ bei -84 ± 1 (^{o}) und damit in guter Übereinstimmung mit einem von Elliot (Lit.118) bestimmten Wert von -80^o.
Dies bestätigt die weitgehende Unversehrtheit der hergestellten Poly-Base $(L\text{-Lys})_n$ hinsichtlich Konfiguration und Kettenlänge.

2.2.2. Poly-L-Cystein :

Poly-L-Cystein konnte in Form des S-Carbobenzoxy-Derivates (Z) mit der Kettenlänge n = 44 von Sigma-Chemie, München, bezogen werden.
Die Entfernung der Z-Schutzgruppe erfolgte reduktiv nach der Vigneaud-Methode mit Natrium in flüssigem Ammoniak gemäß einer Vorschrift von Berger und Katchalski.(Lit.68)
Die mit diesem Verfahren erreichten Ausbeuten an $(L\text{-Cys})_n$ bei den durchgeführten 500 mg-Ansätzen lagen zwischen 40 und 50 % d.Theorie. (Literaturwert :62 %)
Die Elementaranalyse des Produktes ergab einen Schwefelanteil von 25,6 % (Literaturwert : 26,5) gegenüber einem Theoriewert von 31 %. Somit betrug der Schwefelanteil 83 % der Theorie.
Zur Überprüfung, ob der Schwefelanteil in Form von Sulfhydrylgruppen vorlag, diente eine Redoxtitration.
Hierzu wurde eine definierte Menge $(L\text{-Cys})_n$ in einer 2,5 %-igen wässrigen Ammoniaklösung aufgelöst und anschließend eine Überschussmenge einer eingestellten 0,01 n J_2-Lösung in 80 %-igem Eisessig zugegeben. Dann erfolgte Rücktitration von überschüssigem J_2 mit einer 0,01n $Na_2S_2O_3$-Lösung gegen Stärke als Indikator.(Lit.68)
Die Mittelung aus mehreren Titrationen bei verschiedenen $(L\text{-Cys})_n$-Proben lieferte einen Durchschnittswert an freien SH-Gruppen von 80 % der Theorie in guter Übereinstimmung mit dem aus der Elementaranalyse erhaltenem Schwefelgehalt von 83 %.
Hieraus folgt, daß im $(L\text{-Cys})_n$ zwar der gesamte Schwefel in Form von SH-Gruppen anwesend war, daß aber 15 - 20 % des Schwefels unter den Reaktionsbedingungen der Schutzgruppenentfernung vermutlich durch H_2S-Eliminierung unter Bildung von Dehydroalanin verlorengegangen sind.

2.2.3. Natrium-Phenolate :

Zur Herstellung der Natriumsalze von Phenol und der verschiedenen Chlorphenole wurden 0,05 Mol Natrium in kleine Stücke zerteilt, in 100 ml abs. Diäthyläther suspendiert, und dann die äquivalente Menge des jeweiligen Phenols, gelöst in abs. Äther, unter Rühren langsam zugetropft.
Nach 2 - 3 Stunden Rühren war vollständige Umsetzung eingetreten, und nach Abziehen des Lösungsmittels blieb das jeweilige Natrium - salz zurück.
Die Reinigung des Salzes von noch vorhandenen Phenolresten erfolgte durch 24-stündige Sublimation bei 40-60°C im Ölpumpenvakuum.

2.2.4. Tetraäthylammoniumhydroxid - Lösung :

Die wässrige Lösung der quartären Ammonium-Base wurde nach Durchlauf durch einen stark basischen Anionenaustauscher aus dem entsprechenden Chlorid erhalten.
Die Ermittlung des Basengehaltes dieser Lösung erfolgte durch potentiometrische Titration.
Um sicherzustellen, daß kein Eliminierungsprodukt NEt_3 vorlag, wurde eine definierte Menge der titrierten Lösung im Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingeengt und dann wieder in Wasser aufgenommen, und der Basengehalt durch Titration nochmals ermittelt.
Aus den identischen Ergebnissen beider Titrationen konnte die Anwesenheit von NEt_3 ausgeschlossen werden.

2.3. Herstellung der Proben :

2.3.1. Methode der Filmherstellung :

Die Spektren der Polyaminosäuren wurden von dünnen Filmen aufgenommen, die mittels des sog. Zentrifugationstrocknungsverfahrens hergestellt worden waren.(Lit.119)
Bei diesem Verfahren, dessen Hauptvorteil die Reproduzierbarkeit der Schichdicke der Filme darstellt, werden wässrige Lösungen der Polymeren unter Einwirkung der vielfachen Schwerkraft in einer Zentrifuge auf IR-durchlässigen Probenträgern zu Filmen eingetrocknet.

Als Probenträger kamen dabei 2 mm dicke Scheiben aus polykristallinem, p-dotiertem Germanium (Leitfähigkeit 50 $\Omega^{-1}cm^{-1}$) zur Anwendung, auf deren Oberseite eine zylinderförmige Vertiefung mit dem Radius der Zentrifuge eingeschliffen war.
Zur Aufnahme der Polymerlösung und damit zur geometrischen Begrenzung der sich beim Eintrocknen bildenden Filme diente ein auf die Oberseite der Scheibe geklebtes rechteckiges Teflonrähmchen, dessen lichte Weite der Fläche des IR-Strahles des verwendeten IR-Spektrometers entsprach.
In Abbildung 2.1. ist das Schnittbild eines zur Zentrifugationstrocknung verwendeten Zentrifugenbechers gezeigt. Daneben sieht man in Draufsicht einen Ge-Probenträger mit aufgeklebtem Teflonrahmen.

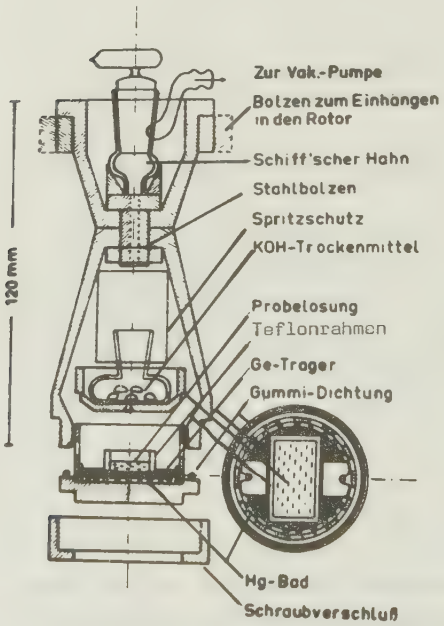


Abbildung 2.1. :
Schnittbild eines Zentrifugenbechers zur Zentrifugationstrocknung

Die mit der Polymerlösung beschickten Probenträger wurden, schwimmend auf einem Hg-Tropfen, zusammen mit einem KOH - oder $CaCl_2$ - Trockengefäß in die in Abbildung 2.1. gezeigten Zentrifugenbecher gesetzt und 12 Stunden bei 15°C mit ca. 2000 RpM in einem Swing-out-Rotor zentrifugiert. Nach Ablauf dieser Zeit konnten in allen Fällen eingetrocknete Polypeptid-Filme erhalten werden.

Der Nachteil bei dem geschilderten Verfahren bestand zunächst in der Klebung des Teflonrahmens auf der Ge-Scheibe, da der verwendete Epoxid-Kleber "Isamet R2" der Fa. Isarchemie, München, von Phenolen und Aminen recht schnell angelöst wurde.
Erst der Epoxid-Kleber "Uniset A 401-12" der Fa. Amicon erwies sich als völlig resistent gegen obige Chemikalien.

2.3.2. Filme der einzelnen Systeme :

2.3.2.1. $(L\text{-}Lys)_n$-Filme :

Je nach gewünschter Schichtdicke wurden zwischen 10 und 40 µÄquivalente (1,3 - 5,1 mg) an $(L\text{-}Lys)_n$ aus den durch Ionenaustausch erhaltenen Polymerlösungen eingetrocknet. Dabei erfolgte zur Vermeidung von CO_2-Adsorption durch die basischen Lösungen die Füllung der Zentrifugenbecher unter Stickstoff.
Die erhaltenen Filme waren völlig klar und mechanisch sehr beständig.

2.3.2.2. $(L\text{-}Lys)_n$ + $HClO_4$-Filme :

Die Herstellung erfolgte durch Zusammenpipettieren von $(L\text{-}Lys)_n$-Lösung und eingestellter 0,1 M $HClO_4$-Lösung im jeweils gewünschten Verhältnis direkt auf dem Probenträger und anschließendes Zentrifugationstrocknen.
Die Probenmengen in den Filmen zur Ermittlung der kontinuierlichen Absorption betrugen 36 µÄquivalente für $(L\text{-}Lys)_n$, während der Gehalt an $HClO_4$ variiert wurde.
Die Filme waren klar und mechanisch beständig.

2.3.2.3. $(L\text{-}Lys)_n$+Chlorphenol-Filme :

Da die meisten Phenole schlecht wasserlöslich und relativ flüchtig sind, erwies es sich als zweckmäßig, diese Filme durch Bedampfen von 10-µÄquivalent-$(L\text{-}Lys)_n$-Filmen mit dem jeweiligen Phenol in einem eigens für diesen Zweck modifizierten Exsiccator herzustellen, wie er in Abbildung 2.2. gezeigt ist.
Hierzu befand sich der Probenträger P mit dem $(L\text{-}Lys)_n$-Film auf der mit Kühlschlangen umwickelten Kühlplatte K, während das aufzudampf-

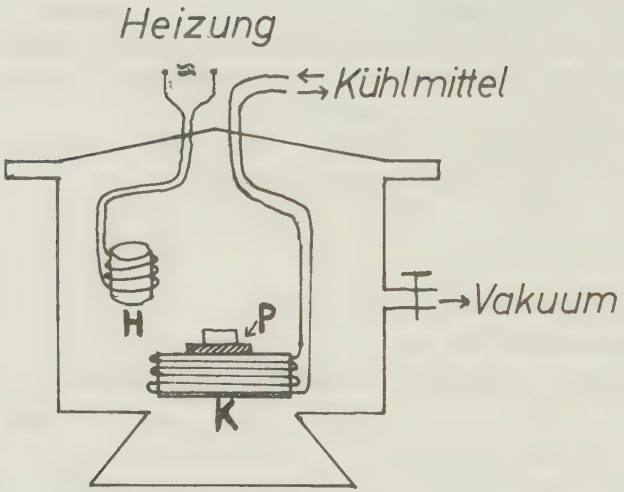


Abbildung 2.2. : Aufdampfexsiccator für die $(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenol-Filme

ende Phenol zur Erhöhung des Dampfdruckes in ein durch Widerstandsheizung erwärmtes Keramikgefäß H gefüllt war.
Nach Anlegen eines Wasserstrahlvakuums, Abkühlen von K auf ca. 5°C und Erwärmen von H auf 40-50°C konnten Assoziate mit einem geringen Phenolüberschuss in einem Zeitraum, der sich je nach Flüchtigkeit des Chlorphenols zwischen 2 Stunden und mehreren Tagen bewegte, erhalten werden.
Der erwähnte Phenolüberschuss erwies sich als notwendig, da beim anschließenden Einsetzen des Probenträgers in die Küvette und bis zur Einstellung eines Dampfdruckgleichgewichtes in derselben das Phenol zum Teil wieder desorbierte.
Um Desorptionsverluste in der Küvette zu verringern, wurde deren Gasraum vor der Beschickung mit dem jeweiligen Phenol gesättigt.

Wie Testversuche ergaben, erwies sich die IR-Absorption des in der Gasphase der Küvette befindlichen Phenols als so gering, daß keine Kompensation von Phenolbanden mit Hilfe der im Vergleichsstrahl befindlichen Gasküvette nötig war.

Die Menge des aufgedampften jeweiligen Chlorphenols konnte nach Auflösen des entsprechenden Filmes in 10 ml eines 1:1-Gemisches von EtOH und 0,1nHCl über die UV-Extinktion am Absorptionsmaximum ermittelt werden.
Je nach Phenol lag das Absorptionsmaximum zwischen 272 nm(Phenol) und 300 nm (Pentachlorphenol).
Die Eichung erfolgte mit Hilfe des jeweiligen Extinktionskoeffizienten am Absorptionsmaximum, der zuvor in Testversuchen ermittelt worden war.
In Tabelle 2.1. sind die entsprechenden Werte für die verschiedenen Phenole aufgeführt.

Tabelle 2.1. :

Verbindung	λ_{max}(nm)(x)	$\varepsilon_{\lambda max}(\frac{1000\ cm^2}{Mol})$ (x)
Phenol	272	1270
3-Cl-Phenol	278	1710
3,4-Dichlorphenol	288	1750
2,3,5-Trichlorphenol	286	2130
2,4,5-Trichlorphenol	294	2610
Pentachlorphenol	300	2310

(x) : gemessen in EtOH/ 0,1n HCl (1:1)

Die Genauigkeit des Verfahrens erlaubte eine Bestimmung des Phenolgehaltes auf $\pm$ 1 µMol, d.h., auf $\pm$10 %.

Eine Korrektur hinsichtlich der UV-Absorption von $(L\text{-}Lys)_n$ erübrigte sich, da im fraglichen Frequenzbereich der Extinktionskoeffizient der Phenole um einen Faktor 100 größer ist.(Lit.62)

Schließlich ließ sich durch Korellation der UV-Ergebnisse einiger derartiger Messungen mit der Intensität charakteristischer, vom Protontransfer unbeeinflußter Phenolbanden im IR-Spektrum (CH-Valenzschwingungen um 3000 cm^{-1})direkt aus dem IR-Spektrum die auf einem Film befindliche Phenolmenge mit hinreichender Genauigkeit vorhersagen.

2.3.2.4. $(L\text{-Cys})_n$-Filme :

Da das gemäß der Vigneaud-Methode erhaltene $(L\text{-Cys})_n$ in wässriger Lösung erst bei pH-Werten größer 8,5 löslich ist, mußten die $(L\text{-Cys})_n$-Filme aus 2,5 %-igen Lösungen von Ammoniak in Wasser eingetrocknet werden.
Zur Vermeidung von Oxidation der Sulfhydrylgruppen wurde frisch ausgekochtes, mit Stickstoff gesättigtes Wasser verwendet. Das Ansetzen der Lösungen erfolgte unter Stickstoff.
Je nach gewünschter Schichtdicke der Filme wurden dabei Lösungen mit Konzentrationen zwischen 20 und 60 µÄquivalente/ml hergestellt, entsprechend 2,1 - 6,2 mg Protein/ml. Diese Lösungen waren bei Aufbewahrung im Kühlschrank unter Luftausschluß mehrere Tage beständig gegenüber Oxidation, was durch Redoxtitration gezeigt werden konnte.

Die für die Filmherstellung verwendeten Probenmengen lagen zwischen 10 und 38 µÄquivalente.(1,0 - 3,9 mg)
Der während des Eintrocknens entweichende Ammoniak wurde von dem als Trockenmittel dienendem $CaCl_2$ gebunden, und die erhaltenen Filme waren völlig klar und frei von Baseresten, was sich an der Unveränderlichkeit des IR-Spektrums von $(L\text{-Cys})_n$-Filmen nach mehrmaligem Hydratisieren zeigte.

2.3.2.5. $(L\text{-Cys})_n$ + N-Base - Filme :

Aus den gleichen wie bei den $(L\text{-Lys})_n$+Phenol-Systemen erwähnten Gründen erwies es sich auch hier als vorteilhaft, die Basen mit Ausnahme von Lysidin, N-α-Benzoyl-argininamid und N-Methyl-guanidin auf die bereits fertig hergestellten $(L\text{-Cys})_n$-Filme aufzudampfen.
Hierfür wurden die ausschließlich verwendeten 10 µÄquivalent-$(L\text{-Cys})_n$-Filme in einem evakuierten Exsiccator mit dem jeweiligen Amin bedampft.
Aufgrund der hohen Dampfdrücke von N-Methyl-imidazol, Propylamin, Dipropylamin und Pyrrolidin war bereits nach Ablauf etwa einer Stunde die Überschussmenge an Base adsorbiert, die erforderlich war, um nach Abzug der Desorptionsverluste bei der Beschickung der Küvette ein 1:1-Verhältnis zu erreichen.
Aufgrund der hohen Dampfdrücke dieser N-Basen kam für die Registrierung der IR-Spektren eine Kurzwegküvette zur Anwendung, wie sie

bereits von Lindemann beschrieben wurde.(Lit.8)
Wegen der extrem kurzen Weglänge des IR-Strahles in dieser Küvette konnten die Absorptionen der Amine in der Gasphase vernachlässigt werden.
Im Gegensatz zu den eben erwähnten Systemen konnten die Filme mit der weniger flüchtigen Base Lysidin direkt durch Zentrifugationstrocknung von wässrigen 2:1-Überschusslösungen an Lysidin erhalten werden. Falls erforderlich, wurde im Exsiccator kurz nachbedampft, um exakte 1:1-Gemische zu erhalten.
Im Falle von N-α-Benzoyl-argininamid und N-Methyl-guanidin erfolgte die Herstellung der 1:1-Filme direkt aus der wässrigen Lösung.

Quantitative Bestimmung des Basengehaltes :

Die Menge der in den Filmen enthaltenen Base konnte durch eine einfache potentiometrische Titration nach Auflösen der Filme in einer definierten Menge 0,1 n KOH, anschließende Überschusszugabe von 0,1 n HCl und folgende Rücktitration mit 0,1 n KOH bis zum Umschlagspunkt bei pH_7 ermittelt werden.
Unter Zugrundelegung des pK_a-Wertes 8,3 von monomerem Cystein für das verwendete $(L\text{-Cys})_n$ ist zu folgern, daß bei pH_7 weniger als 10% der SH-Gruppen dissoziiert sind, d.h., daß aus dem KOH-Verbrauch am Umschlagspunkt der Titration der Gehalt an N-Base zuverlässig mit einem relativ kleinen Fehler bestimmt werden kann.
Darüberhinaus dürfte in Analogie zu anderen Polyaminosäuren (Lit. 17, 38) der pK_a-Wert von $(L\text{-Cys})_n$ aufgrund der elektrostatischen Abstoßung gleichsinnig geladener Gruppen höher als derjenige der freien monomeren Aminosäure liegen, sodaß der systematische Fehler noch kleiner als 10 % sein dürfte.

2.3.2.6. $(L\text{-Cys})_n + NEt_4^+OH^-$-Filme :

Die Filme wurden, dem jeweils gewünschten Verhältnis entsprechend, durch Vermischen und anschließendes Zentrifugationstrocknen von ammoniakalischer $(L\text{-Cys})_n$-Lösung und $NEt_4^+OH^-$-Lösung jeweils bekannten Gehaltes direkt auf dem Probenträger hergestellt.
Die Filme zur Untersuchung der kontinuierlichen Absorption von $(SHS)^-$-Brücken bestanden aus 38 µÄquivalenten $(L\text{-Cys})_n$, waren glasklar und mit zunehmendem Basengehalt äußerst hygroskopisch.

2.3.2.7. $(L\text{-Glu})_n$ bzw. $(L\text{-Asp})_n$ + $NEt_4^+OH^-$- Filme :

Da sich in Analogie zu $(L\text{-Cys})_n$ auch $(L\text{-Glu})_n$ und $(L\text{-Asp})_n$ erst nach Basenzugabe in Wasser lösen, mußte zur Einstellung des erforderlichen pH-Wertes in den einzutrocknenden Lösungen eine leicht flüchtige Base in geringen Mengen zugegeben werden, die keinen zu hohen pK_a-Wert besitzen durfte, da andernfalls Salzbildung eingetreten wäre. Wässrige NH_3-Lösungen wie bei $(L\text{-Cys})_n$ kamen deshalb hier nicht in Frage, weshalb als Base Pyridin gewählt wurde. Verwendung fanden dabei Gemische von H_2O : Pyridin im Volumenverhältnis 9,5 : 0,5 ml.
Die Herstellung der Filme erfolgte dann in völlig analoger Weise wie unter 2.3.2.6. beschrieben wurde.
Die Menge an $(L\text{-Glu})_n$ in den Filmen zur Bestimmung der kontinuierlichen Absorption betrug 31 µÄquivalente.
Über Beschaffenheit und Hygroskopie der Filme gilt das bereits für $(L\text{-Cys})_n$+$NEt_4^+OH^-$ gesagte.

2.3.2.8. $(L\text{-Cys})_n$ + $(L\text{-Lys})_n$- Filme :

Die beim Zusammenpipettieren von unter 2.3.2.4. beschriebener $(L\text{-Cys})_n$-Lösung und unter 2.2.1. beschriebener $(L\text{-Lys})_n$-Lösung im Verhältnis 1:1 sofort auftretende Niederschlagsbildung konnte durch Zugabe einiger Tropfen konzentrierter Ammoniaklösung verhindert werden.
Zentrifugationstrocknung über $CaCl_2$ lieferte dann schwach trübe Filme, die frei von NH_3 waren und eine Tendenz zum Abblättern zeigten.
Dem jeweiligen Bedarf entsprechend lagen die Probenmengen zwischen 10+10 und 38+38 µÄquivalente pro Film.

2.3.2.9. $(L\text{-Lys})_n$ + $(L\text{-Tyr})_n$- Filme :

Die Herstellung erfolgte in völliger Analogie zu $(L\text{-Lys})_n$+ $(L\text{-Cys})_n$ durch Zusammenpipettieren von $(L\text{-Lys})_n$-Lösung und 4 %-iger ammoniakalischer $(L\text{-Tyr})_n$-Lösung unter Zugabe einiger Tropfen von konz. Ammoniak und anschließendes Zentrifugationstrocknen.
Die Probenmengen betrugen 9+9 µÄquivalente pro Film. Dickere Filme waren wegen starker Neigung zum Abblättern nicht herstellbar.

2.3.2.10. Statistisches Copolymeres copoly(L-Tyr, L-Lys)$_n$:

Das Hydrobromid des Copolymeren copoly(L-Tyr, L-Lys·HBr)$_n$, welches wasserlöslich ist, konnte von MILES, Rehovot, mit der Kettenlänge n = 110 bezogen werden und lieferte klare stabile Filme.

Da sich die HBr-freie Verbindung nach Dialyse als wasserunlöslich erwies, wurde die HBr-Entfernung aus den copoly(L-Tyr, L-Lys·HBr)$_n$-Filmen durch Ionenaustausch direkt auf dem Probenträger durchgeführt.

Dazu wurde der HBr-haltige Film im Stickstoffstrom vorsichtig mit 0,5 ml einer 0,01 n NaOH überschichtet und nach kurzem Einwirken die NaOH wieder abpipettiert. Dieser Vorgang mußte sooft wiederholt werden, bis die abpipettierte NaOH Br^--frei war. Hierfür waren 8 - 10 Cyclen erforderlich.

Anschließend wurde mit dest. Wasser nachgewaschen, bis das Waschwasser neutral war.

Bei diesen Manipulationen trat keine Zerstörung des Filmes ein, da er sich, wie bereits erwähnt, mit zunehmender HBr-Entfernung als wasserunlöslich erwies.

Allerdings funktionierte dieses Austauschverfahren wegen Neigung zum Abblättern nur bei relativ dünnen Filmen von 10 µÄquivalenten.

2.3.2.11. (L-Lys)$_n$ + (L-Glu)$_n$ - Filme :

Die sofortige Niederschlagsbildung beim Zusammenpipettieren von (L-Lys)$_n$-Lösung und Pyridinhaltiger (L-Glu)$_n$-Lösung im 1:1-Verhältnis konnte durch eine Überschusszugabe von Pyridin vermieden werden.

Anschließendes Zentrifugationstrocknen über $CaCl_2$ und folgendes mehrtägiges Hydratisieren des Filmes im Exsiccator bei 77 % rel. Luftfeuchtigkeit lieferte klare Filme, deren IR-Spektren frei von Pyridin-Banden waren.

Die verwendeten Probenmengen lagen bei 10+10 µÄquivalenten.

2.3.2.12. (L-Glu)$_n$ + (L-His)$_n$ - Filme :

Als gravierendes Problem bei dieser Kombination erwies sich das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten von (L-Glu)$_n$ und

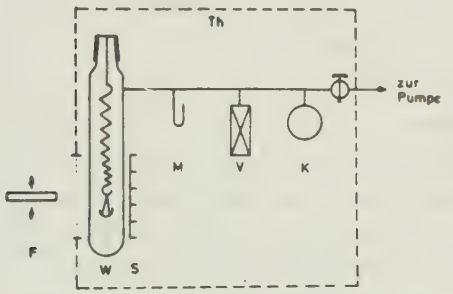
$(L\text{-His})_n$ in Wasser.
Während nämlich $(L\text{-Glu})_n$ nur bei zusätzlicher Basenzugabe löslich ist, erfolgt Auflösung von $(L\text{-His})_n$ nur im schwach sauren Milieu. So lassen sich $(L\text{-His})_n$-Filme vorteilhaft aus wässrigen Essigsäure-Lösungen eintrocknen (Lit.11), während die Herstellung von $(L\text{-Glu})_n$-Filmen aus Pyridin-haltigen Lösungen möglich ist.
Deshalb wurde in folgender Weise verfahren :
Nach der Einwaage von äquimolaren Mengen beider Komponenten (je nach Ansatz zwischen 300 und 400 mg pro Partner) erfolgte Suspension des Gemisches in 10 ml dest. Wasser.
Bereits nach kurzem Rühren änderte sich die Beschaffenheit der Suspension und es bildete sich ein feinverteilter weißer Niederschlag, der dem Addukt zuzuschreiben ist.
Nach weiteren 24 Stunden Rühren bei Zimmertemperatur wurde der Niederschlag abzentrifugiert und im Ölvakuum getrocknet.
Das Gewicht der eingetrockneten Substanz betrug 96 % des aus der Summe der Einwaagen der beiden Komponenten gebildeten Gewichtes.
Darüberhinaus zeigte das UV-Spektrum des Überstandes im Bereich zwischen 205 und 280 nm, daß nur minimale Mengen an Polypeptid in Lösung gegangen waren,und daß somit der Niederschlag das gebildete 1:1-Addukt darstellen mußte.
Der bekannte Sachverhalt, daß wasserunlösliche Polyaminosäuren wie z.B. $(L\text{-Ser})_n$ in hochkonzentrierten wässrigen LiBr-Lösungen löslich werden,(Lit. 116, 120, 121) erwies sich auch hier als zutreffend. So war das Addukt in ca. 10 ml einer 8-8,5 M LiBr-Lösung vollständig löslich.
Diese Lösung wurde dann zur Entfernung von LiBr gegen dest. Wasser dialysiert. Hierzu war ein spezieller benzoylierter Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von MG = 2000 (Sigma Chemie, München) nötig, da die Molekulargewichte der verwendeten Polyaminosäuren relativ klein waren.(MG_{Glu} = 38800, MG_{His} = 5000 bis 15000 je nach Versuch)
Der sich mit zunehmender LiBr-Entfernung neuerlich bildende Niederschlag an Addukt fiel dabei in einer derart feinen Verteilung an, daß die nach restloser Entfernung von LiBr gebildete Suspension direkt zur Herstellung von Filmen dienen konnte, deren wellenlängenabhängiges Streuverhalten noch erträglich war.
Dazu wurden die mit der Suspension gefüllten Probenträger im Exsic-

cator über KOH eingetrocknet. Die verwendete Probenmenge war 8+8 µÄquivalente.
Der Gehalt an Addukt in der Suspension ließ sich durch einfache Gewichtsbestimmung eines Aliquots der Suspension nach sorgfältigem Eintrocknen bestimmen.

2.4. Bestimmung des Wassergehaltes von Filmen mit der Adsorptionswaage :

2.4.1. Beschreibung der Adsorptionswaage :

Für einige Systeme erwies es sich als notwendig, die Anzahl adsorbierter Wassermoleküle pro Peptidrest bei definierten relativen Luftfeuchtigkeiten zu ermitteln.
Hierfür hatte sich bereits in früheren Untersuchungen (Lit.5, 8) eine Quarzfeder-Adsorptionswaage gut bewährt.
In Abbildung 2.3. ist die verwendete Waage schematisch dargestellt.



Adsorptionswaage
F Fernrohr
W Waage
M Manometer
V Voratsbehälter
K Küvette
Th Thermostatkasten mit Fenster
S Spiegelskala

Abbildung 2.3. : Quarzfeder-Adsorptionswaage zur Bestimmung des adsorbierten Wassers

In der Adsorptionswaage kann eine definierte rel. Luftfeuchtigkeit durch eine gesättigte wässrige Salzlösung eingestellt werden.(Lit.58) Ein an der Quarzfeder befestigter trägerfreier Polypeptidfilm von 30 - 40 µÄquivalenten bewirkt durch eine der Luftfeuchtigkeit entsprechende Wasseraufnahme eine Längenänderung der Feder, welche über die Federkonstante den Beladungsgrad zu bestimmen gestattet.

Die Empfindlichkeit der Quarzfeder wurde zu 4,31 $\frac{mm}{mg}$ ermittelt. Bei einer Ablesegenauigkeit von 0,5 mm betrug somit die unterste Erfassungsgrenze 0,12 mg, entsprechend 6,7 µMol Wasser. Bei Untersuchung von 30 - 40 µÄquivalent-Filmen konnten also noch minimal 0,2 Moleküle Wasser pro Peptidrest nachgewiesen werden.

2.4.2. Herstellung von trägerfreien Polypeptid-Filmen :

Diese erfolgte nach dem Zentrifugationstrocknungsverfahren aus Polymerlösungen, die 30 - 40 µÄquivalente an Polypeptid enthielten. Hierbei befand sich auf dem Probenträger eine dünne, genau in den Rahmen passende Teflonfolie.
Nach Eintrocknen des Filmes auf der Teflonfolie konnte dieser in wenigen Teilstücken von der Folie gehoben und an die Quarzwaage gehängt werden.
Mit dieser Methode wurden Filme von $(L\text{-Lys})_n$, $(L\text{-Cys})_n$, $(L\text{-Lys})_n$+ + $HClO_4$ und $(L\text{-Cys})_n$+$NEt_4^+OH^-$ hergestellt,und anschließend deren Hydratationsgrade bestimmt.

2.5. Aufnahme der Spektren :

2.5.1. Beschreibung der Küvetten :

Die mit den Polymerfilmen bedeckten Germanium-Probenträger wurden unter Stickstoff in evakuierbare Spezialküvetten montiert, wie sie im Prinzip bereits früher beschrieben wurden.(Lit.58) Diese Küvetten, die mit zwei IR-durchlässigen Fenstern versehen sind, gestatten es, mit Hilfe von gesättigten wässrigen Salzlösungen eine definierte rel. Luftfeuchtigkeit im Gasraum über dem Film einzustellen, bzw. die Probe über einem Trockenmittel oder an der Ölpumpe angeschlossen zu trocknen.
Um Temperaturkonstanz während der Messung zu gewährleisten, sind die Küvetten thermostatisierbar.
Alle Spektren wurden bei 25°C aufgenommen.

Für die Aufnahme der mit flüchtigen Aminen bedampften $(L\text{-Cys})_n$-Filme kam eine Kurzwegküvette zur Anwendung, die aus Kleinflansch-Bauteilen der Fa. Leybold zusammengesetzt ist,und bereits von Lindemann (Lit.8) beschrieben wurde. Der Vorteil dieser Küvette gegen-

über der obig beschriebenen besteht darin, daß IR-Absorption durch gasförmiges Amin vermieden werden konnte.
Als Fenstermaterial dienten Ge- oder Si-Scheiben von 2mm Dicke, da das Fenstermaterial KRS-5 durch die Amine angegriffen wurde.

Zur Kompensation der Absorptionsverluste durch Fenstermaterialien, Probenträger und Wasserdampf bei Hydratation diente im Vergleichsstrahlengang für jede der beiden Küvettenarten jeweils eine evakuierbare Gasküvette mit einstellbarer rel. Luftfeuchtigkeit und identischem Strahlengang wie bei der Probenküvette.

2.5.2. Hydratisierung der Filme :

Die Hydratisierung der Filme erfolgte in der evakuierbaren Küvette durch Anschluss eines Voratsgefäßes mit einer gesättigten Salzlösung.
In allen Fällen hatte sich bereits nach maximal 12-stündigem Stehen über der Salzlösung bei 25°C eine konstante Hydratation auf den Filmen eingestellt.
Folgende gesättigte Salzlösungen kamen zur Anwendung :

Salz	rel.Luftfeuchtigkeit bei 25°C (%) (nach Lit.58)
$K_2Cr_2O_7$	98
$BaCl_2$	90
NaCl	75
NaBr	58
$MgCl_2$	33
LiCl	11

2.5.3. Trocknung der Filme :

Die meisten Filme ließen sich in der Küvette innerhalb von 24 Stunden über P_2O_5 soweit trocknen, daß IR-spektroskopisch kein Wasser mehr nachweisbar war.
Bei den sehr hygroskopischen Filmen mit $NEt_4^+OH^-$ erwies sich dagegen eine mehrstündige Trocknung im Ölpumpenvakuum mit zwischengeschalteter Kühlfalle als nötig.

2.5.4. Registrierung der IR-Spektren :

Für die Aufnahme der Spektren stand ein Doppelstrahl-Gitter-Spektrophotometer Modell 325 der Fa. Bodenseewerk, Perkin-Elmer, Überlingen, mit Spülvorrichtung des Strahlenganges zur Verfügung. Folgende Einstellungen des Spektrometers wurden benutzt:

Spaltprogramm 8 (wegen der hohen Reflexionsverluste durch Ge und KRS 5-Fenster)

Zeitkonstante 2

Verstärkung je nach Bedarf (5-10 % Überschwingungen)

Vorschubgeschwindigkeit 1 - 4 , je nach Bandenverlauf

Bei den Spektren, die ohne Abszissendehnung aufgenommen wurden, lag die Genauigkeit der Ablesung bei ± 3 cm^{-1} im Bereich oberhalb 2000 cm^{-1}, und bei ± 1 cm^{-1} im Bereich unterhalb 2000 cm^{-1}.

In vielen Fällen wurden einzelne, zur quantitativen Auswertung herangezogene Banden mit 2- oder 3-facher Ordinatendehnung und - oder - je nach Bedarf mit 1,8-facher oder 8-facher Abszissendehnung registriert.

Zur exakten Bestimmung der Wellenzahl wichtiger Banden erfolgte deren Aufnahme meist mit 1,8-facher Abszissendehnung.

Im Unterschied zu den oben aufgeführten Geräteparametern der ungedehnten Spektren war es bei gedehnter Registrierung notwendig, die Zeitkonstante auf 3 oder 4 zu erhöhen und die Vorschubgeschwindigkeit auf unter 1 zu verringern.

2.6. Quantitative Auswertung der Spektren :

Die vorliegenden IR-Spektren wurden hinsichtlich der folgenden fünf Hauptgesichtspunkte untersucht:

1) Konformation des Rückgrates
2) Ausmaß der Hydratation
3) Grad der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Proton-Donor und Acceptor
4) Größe des Protontransfers in den Wasserstoffbrücken
5) Intensität und Form der kontinuierlichen Absorption

Im folgenden sollen die verschiedenen Verfahren, vermittels derer Information über die 5 genannten Punkte gewonnen wurde, erläutert werden.

2.6.1. Ermittlung der Rückgratkonformation :

Information über die Konformation von Proteinen kann IR-spektroskopisch aus der Lage der sogenannten Amid-Banden des Rückgrates erhalten werden.
So hat die Zuordnung des IR-Dichroismus der Amid-Banden zu ihrer Absorptionsfrequenz bei den IR-Spektren einer großen Zahl von orientierten Polyaminosäure-Filmen eine eindeutige Korellation zwischen Bandenlage und Rückgratkonformation ermöglicht, da IR-Dichroismus-Messungen an orientierten Filmen eine Unterscheidung zwischen Faltblatt- und Helix-Konformation ermöglichen.(Lit.82, 83, 122-126)

Das Ergebnis der erwähnten Untersuchungen ist in Tabelle 2.2. gezeigt. (nach Lit.122)

Tabelle 2.2. :

Konformation	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})
α-Helix	1652-1657	1545-1551
β-Struktur	1628-1635	1521-1525

Blout und Miyazawa (Lit.123) beobachteten die Amid I-Bande bei helikaler Konformation bei mehreren Polypeptiden bei 1650 cm^{-1}, während die Amid-II-Bande laut diesen Autoren für β-Struktur bei 1530 cm^{-1} erscheint.
Eine Zuordnung von Amid-I und Amid-II-Bande ist in Lit.127 gegeben.
Eine weitere Bestätigung des Zusammenhanges zwischen Lage der Amid-Banden und Rückgratkonformation lieferte der Vergleich mit Röntgenbeugungsuntersuchungen an orientierten Polyaminosäure-Filmen. (Lit.128,129)
Daneben konnten Miyazawa und Blout (Lit.123) den Zusammenhang zwischen Lage von Amid-I-und Amid-II-Bande und Konformation auch theoretisch erklären.

Wie aus Tabelle 2.2. ersichtlich ist, ermöglicht die Beobachtung von Amid-I- und Amid-II-Bande nicht die Identifizierung einer geknäuelten Anordnung des Rückgrates.
Hierzu kann stattdessen die Amid-A-Bande herangezogen werden, auf die im folgenden eingegangen wird.

Die N-H-Valenzschwingung liefert zu zwei Banden einen Beitrag.Die Amid-A um 3300 cm^{-1} hat bekanntlich N-H-Valenzschwingungscharakter,

während die Amid-B-Bande nahe bei 3100 cm^{-1} den Charakter der 1.Oberschwingung der C=O-Valenzschwingung besitzt, die durch Fermi-Resonanz mit der N-H-Valenzschwingung bei 3300 cm^{-1} an Intensität gewinnt. (Lit.130)
Im Allgemeinen liegt das Intensitätsverhältnis von Amid-A zu Amid-B bei 9:1, sodaß man in guter Näherung die N-H-Valenzschwingung durch die Amid-A-Bande als repräsentiert betrachten kann.(Lit. 32)
Lage und insbesondere Halbwertsbreite der Amid-A erweisen sich als charakteristisch für die jeweils vorliegende Konformation.(Lit. 31)
Die Zusammenhänge sind in Tabelle 2.3. gezeigt.

Tabelle 2.3. :(nach Lit. 31)

Konformation	Amid-A (cm^{-1})	Halbwertsbreite (cm^{-1})
α-Helix	um 3300	56 - 90
antiparal. β	3266-3300	56 - 90
Knäuel	3250-3300	150-200

Die in Tabelle 2.3. aufgeführten Ergebnisse wurden aus IR-Spektren von verschiedenen Polyaminosäuren und Proteinen bekannter Struktur gewonnen.(Lit. 32)
Die 2-bis 3-fache Zunahme der Halbwertsbreite der Amid-A-Bande bei Vorliegen von Knäuel wird der Realisierung einer breiten Verteilung von geometrisch unterschiedlichen Wasserstoffbrücken im Rückgrat zugeschrieben.(Lit. 32)
Weiterhin zeigt Tabelle 2.3., daß bei Knäuel-Bildung eine Verschiebung des Maximums zu kleinen Wellenzahlen erfolgt. Dies wird auch durch Messungen am $(L\text{-His})_n$ bestätigt.(Lit.11)

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß die Unterscheidung zwischen α-Helix und antiparalleler β-Struktur am besten mit Hilfe von Amid-I- und Amid-II-Bande gelingt, während die Unterscheidung zum Knäuel mittels der Amid-A-Bande gut möglich ist.

2.6.2. Ausmaß der Hydratation :

Das Ausmaß der Hydratation der Polypeptid-Filme konnte aus der Intensität der OH-Valenzschwingung des angelagerten Wassers im Bereich zwischen 3500 und 3000 cm^{-1} ermittelt werden.

In einigen Fällen erfolgte eine Eichung der gemessenen Wasserbande mit Hilfe der Gewichtszunahme eines analogen Filmes bei Hydratation in der Adsorptionswaage.

2.6.3. Grad der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Protondonor und Acceptor :

Für ein solvatisiertes 1:1-Gemisch, bestehend aus einem Paar von Donor und Acceptor (AH und B), existieren folgende Gleichgewichte: (Lit.1)

$$(AH)_s + (B)_s \overset{K_a}{\rightleftharpoons} (A\text{-}H\ldots B)_s \overset{K_t}{\rightleftharpoons} (A^-\ldots H\text{-}B^+) \overset{K_d}{\rightleftharpoons} (A^-)_s + (BH^+)_s$$

$$\Downarrow\Uparrow$$

2:2-Komplex

Die isoliert solvatisierten Spezies $(AH)_s$ und $(B)_s$ stehen über die Assoziationskonstante K_a mit dem solvatisierten verbrückten Komplex $(A\text{-}H\ldots B)_s$ in Verbindung, während die Transferkonstante K_t als hier allein interessierende Größe die Lage des Gleichgewichtes zwischen letzterem und und dem solvatisierten Protontransferkomplex $(A^-\ldots H\text{-}B^+)_n$ beschreibt. Dieser wiederum steht über die Dissoziationskonstante K_d mit den isolierten solvatisierten Ionen $(A^-)_s$ und $(BH^+)_s$ im Gleichgewicht.

Im Falle der hier vorliegenden Untersuchungen können, zumindest bei den wasserfreien Systemen, die ja frei von Lösungsmittel sind, die Konstante K_d und damit nachfolgende Homokonjugationsgleichgewichte vernachlässigt werden, da bereits früher an zahlreichen Donor-Acceptor-Systemen gezeigt wurde, daß die Dissoziation des Protontransferkomplexes nur durch stark polare Lösungsmittel mit hoher DK ermöglicht wird.(Lit.1)

Deshalb war für die Auswertung der vorliegenden Spektren die Frage von wesentlichem Interesse, ob bei Hydratisierung der Filme die durch K_a und K_d repräsentierten Gleichgewichte nicht berücksichtigt werden mußten, d.h., ob vollständige Komplexbildung erhalten geblieben war.

Dies konnte überprüft werden anhand des Auftretens von Banden, die sensitiv auf die Ausbildung bzw. Nichtausbildung von Wasserstoffbrücken reagieren.

Dies trifft vor allem für die A-H-Valenzschwingung des Protondonors zu, die ja bei Nichtassoziation z.B. bei Phenolen und Thiolen als

relativ scharfe Bande bei vergleichsweise hohen Wellenzahlen erscheint, während bei Brückenbildung eine Verlagerung nach niedrigeren Wellenzahlen und starke Verbreiterung sowie mehr oder minder starke kontinuierliche Absorption auftritt.
Als guter Indikator für Ausbildung von Wasserstoffbrücken erwiesen sich hier auch Deformationsschwingungen der Gruppierung A-H, die bei Brückenbildung bekanntlich zu höheren Wellenzahlen verschoben werden.(Lit.15)

2.6.4. Grad des Protontransfers :

Der Grad des Protontransfers innerhalb der gebildeten Brükken, bzw., die Protontransferkonstante $K_t = \frac{(A^- \ldots H\text{-}B^+)}{(A\text{-}H \ldots B)}$ in allen untersuchten Systemen wurden ermittelt durch Auswertung des integralen Intensitätsverhältnisses jeweils einer für den protonierten und einer für den unprotonierten Zustand charakteristischen Bande von Protondonor oder Acceptor.

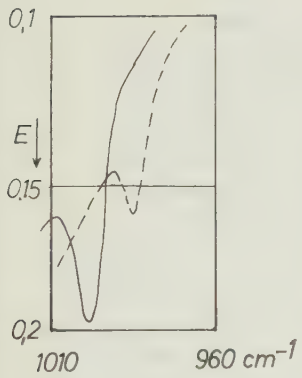
2.6.4.1. Auswerteverfahren am System $(L\text{-}Lys)_n$+Chlorphenole :

Als Referenzsystem zur Bestimmung von K_t dienten charakteristische Banden des jeweiligen Chlorphenols, bzw. des korespondierenden Natriumsalzes.
Die herangezogenen Bandenpaare der verschiedenen verwendeten Chlorphenole sind in Abbildung 2.4. und Tabelle 2.4. zusammengestellt.

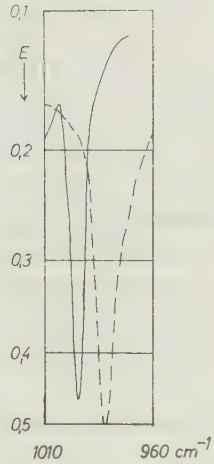
In Abbildung 2.4. ist die phenolspezifische Bande jeweils in durchgezogener Linie gezeichnet, während die Bande des entsprechenden Natrium-Salzes gestrichelt ist. Die unterschiedlichen Ordinaten- bzw. Abszissendehnungen waren durch die unterschiedlichen Bandenintensitäten bedingt.

Tabelle 2.4. :

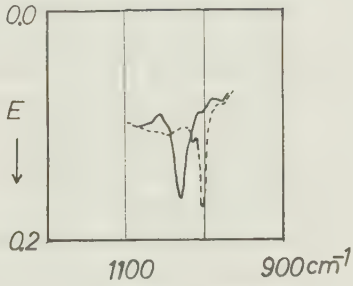
	Bandenlage (cm^{-1})	
Substanz	-O-H-Form	Natriumsalz
Phenol	998	985
3-Chlorphenol	995	983
3,4-Dichlorphenol	1024	1001
2,4,5-Trichlorphen.	1077	1050
2,3,5-Trichlorphen.	1103	1095
Pentachlorphen.	1185	1210



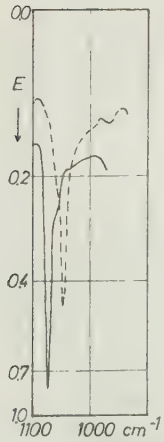
Phenol



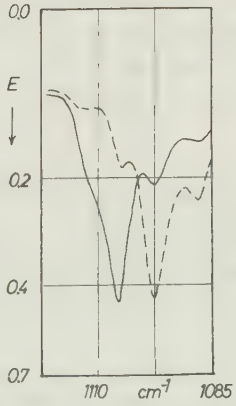
3-Cl-Phenol



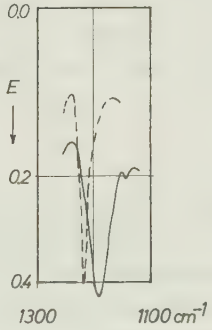
3,4-Dichlorphen.



2,4,5-Trichlorphen.



2,3,5-Trichlorphen.



Pentachlorphenol

Abbldung 2.4. : Lagen der zur Bestimmung des Protontransfers herangezogenen Chlorphenol- bzw. Chlorphenolat-Banden.

(——) : Chlorphenol
(- - -): Entsprechendes Natriumsalz

Eine eindeutige Bandenzuordnung erwies sich nur im Falle des Pentachlorphenols als möglich. Dort wird die phenolspezifische Bande bei 1185 cm^{-1} der O-H-Deformationsschwingung zugeschrieben.(Lit.131)
In allen anderen Fällen dürften die herangezogenen Banden aromat-

ischen Ringschwingungen zuzuordnen sein.(Lit.70)

Zur Eichung wurden definierte Gemische von variablem Phenol- und Natriumphenolat-Gehalt in Nujol suspendiert und das gemessene Verhältnis der integralen Extinktion des relevanten Bandenpaares gegen die Phenol-Phenolat-Zusammensetzung des jeweiligen Gemisches aufgetragen. Dieses Verfahren lieferte Eichgeraden, die es gestatteten, aus den Intensitätsverhältnissen der entsprechenden Banden in den Spektren der $(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenol-Assoziate das jeweilige Phenol- zu Phenolat-Verhältnis und damit das Ausmaß des Protontransfers zu bestimmen.

Die Zulässigkeit des geschilderten Verfahrens beruht auf der Voraussetzung, daß die herangezogenen Eichbanden des jeweiligen Phenol-Phenolat-Paares in Extinktionskoeffizient und Bandenlage identisch sind mit denen des über Wasserstoffbrücken gebundenen Phenols im Komplex mit $(L\text{-Lys})_n$.

Die Gültigkeit dieser Voraussetzung wurde durch Bestimmung der annähernden Konstanz von Extinktionskoeffizient und Bandenlage in verschieden stark solvatisierenden Lösungsmitteln wie D_3CCN, CH_3NO_2, d_7-DMF und CCl_4 bei einigen Systemen überprüft.

2.6.4.2. Auswerteverfahren am System $(L\text{-Cys})_n$+ N-Basen:

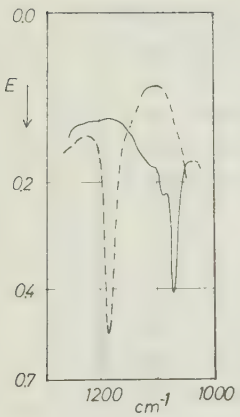
In analoger Weise wie oben erfolgte die Ermittlung des Protontransfers, bzw. der K_t-Werte in diesen Systemen anhand von Eichbanden, die aus Amin- bzw. Aminhydrochlorid-Spektren entnommen worden waren.

In Abbildung 2.5. sind die Eichbandenpaare abgebildet. Dabei ist die jeweils durchgezogen gezeichnete Bande typisch für das Amin, während die gestrichelten Banden charakteristisch für das dazugehörige Hydrochlorid sind.

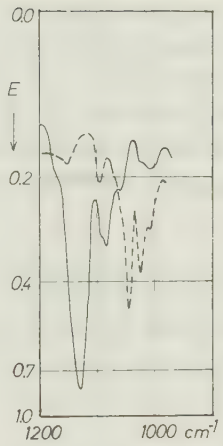
Die herangezogenen Banden sind in Tabelle 2.5. zusammengestellt und lassen sich folgendermaßen zuordnen: (Lit.70)

Tabelle 2.5. :

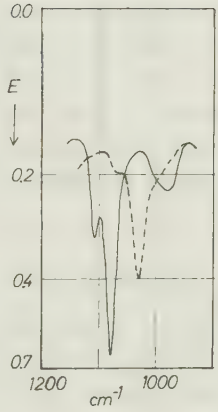
Substanz	Bandenlage (cm^{-1}) Amin	Amin-Hydrochlorid
Propylamin	1071	1190
Dipropylamin	1125	1044, 1024
Lysidin	1020, 995	1040
Pyrrolidin	1078	1028



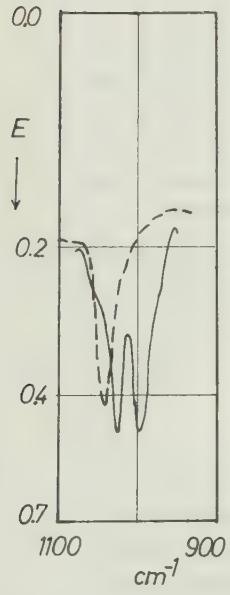
Propylamin



Dipropylamin



Pyrrolidin



Lysidin

Abbildung 2.5. :Lagen der zur Bestimmung des Protontransfers herangezogenen Amin- bzw. Amin-Hydrochlorid-Banden.

(——) : Amin
(- - -): Zugehöriges Hydrochlorid

Bei Dipropylamin und Pyrrolidin wurde die bei Protonierung der Aminogruppe resultierende Verschiebung der C-N-Valenzschwingung zu kleinen Wellenzahlen ausgenutzt.

Bei Propylamin diente im unprotonierten Fall gleichfalls die C-N-Valenzschwingung bei 1071 cm^{-1} als Eichbande, während für die protonierte Spezies eine sehr intensive, lösungsmittelunabhängige Bande bei 1190 cm^{-1} verwendet wurde.

Im Falle von Lysidin fand zur Identifizierung der protonierten Spezies die C-N-Valenzschwingung Verwendung, während die herangezogene Basenbande ebenfalls nicht zuzuordnen war.
Bei N-α-Benzoyl-argininamid und N-Methylguanidin schließlich war das vollständige Verschwinden der SH-Valenzschwingung von $(L\text{-Cys})_n$ der Indikator für spektroskopisch vollständigen Protontransfer.

2.6.5. Graphische Darstellung der Protontransfer-Messungen :

Die im $(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenole-System und im $(L\text{-Cys})_n$+ N-Base-System mit dem oben beschriebenen Verfahren erhaltenen Werte für den Protontransfer ließen sich nun auf verschiedene Weise darstellen.
Einerseits wurde der sog. Protontransfer (Maßzahl %), andererseits der Logarithmus der Transferkonstante K_t gegen den ΔpK_a aufgetragen.
Dabei ist der ΔpK_a,wie folgt, definiert :

$$\Delta pK_a = pK_{a(BH^+)} - pK_{a(AH)} ,$$

wobei $pK_{a(BH^+)}$ = pK_a-Wert der protonierten Base (Protonacceptor),
und $pK_{a(AH)}$ = pK_a-Wert der Säure (Protondonor)

Der in % ausgedrückte Protontransfer PT ist durch das Mengenverhältnis von Protontransferkomplex zur Gesamtzahl an Komplex gemäß

$$PT\ (\%) = \frac{(A^-\ldots H\text{-}B^+)\cdot 100}{(A^-\ldots H\text{-}B^+) + (A\text{-}H\ldots B)}$$ gegeben,und ist somit dem Molenbruch an Protontransferkomplex äquivalent.
Experimentell ergibt sich PT aus dem Verhältnis

$$\frac{n_{Phenolat}\cdot 100}{n_{Phenol} + n_{Phenolat}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{n_{Ammonium}\cdot 100}{n_{Amin} + n_{Ammonium}} .$$

Die Auftragung von PT (%) gegen den jeweils zugehörigen ΔpK_a-Wert für jedes der beiden Systeme lieferte eine charakteristische Kurve, aus deren Verlauf Schlüsse auf die Symmetrie der jeweiligen Protondonor-Acceptor-Familie und das Ausmaß der Kooperativität bei eventuellen Konformationsänderungen des Rückgrates des Polypeptids gezogen werden konnten. Siehe hierzu auch Lit.5,11.

Die Transferkonstante K_t andererseits folgt lt. ihrer Definition $K_t = \frac{(A^{-}...H-B^{+})}{(A-H...B)}$ direkt aus dem spektroskopisch ermittelten $\frac{\text{Phenolat}}{\text{Phenol}}$ - bzw. $\frac{\text{Ammonium}}{\text{Amin}}$ - Verhältnis.

Trägt man nun den log K_t für jedes Donor-Acceptor-Paar gegen den dazugehörigen ΔpK_a-Wert auf, so erhält man eine Gerade der Form: $\log K_t = \xi\, pK_a - \delta$, welche theoretisch von Huyskens (Lit.132) für Wasserstoffbrücken-Systeme in Lösung abgeleitet wurde.
Die Konstanten ξ und δ sind dabei für das betrachtete jeweilige Donor-Acceptor-System und das verwendete Lösungsmittel spezifisch. Nach Huyskens hängt δ hauptsächlich vom Lösungsmittel und ξ vom Lösungsmittel und der Natur der jeweiligen Donor-Acceptor-Familie ab.

2.6.6. Auswertung der kontinuierlichen Absorption :

In den Systemen, welche die Herstellung hinreichend dicker, nichtstreuender Filme ermöglichten, konnten Intensität und wellenzahlabhängiger Verlauf der kontinuierlichen Absorption, die bei Ausbildung von symmetrischen, leicht polarisierbaren Wasserstoffbrücken eintritt (Lit.50), beobachtet werden.
Da der wellenzahlabhängige Verlauf der kontinuierlichen Absorption sehr stark von der Brückenlänge abhängt,(Lit.29) ließen sich durch Vergleich der gemessenen Systeme mit gerechneten Spektren bei verschiedener Brückenlänge(Lit.29) qualitative Aussagen über die Brückenlängen der einzelnen untersuchten Systeme machen.

3. Ergebnisse an strukturunsymmetrischen Wasserstoffbrücken

3.1. Messungen an $OH...N \rightleftharpoons O^-...HN^+$ - Brückensystemen

3.1.1. Poly-L-Lysin + Chlorphenole

3.1.1.1. Übersicht über die Systeme:

Anhand dieser Systeme sollte die Natur der Wasserstoffbrücke, die sich zwischen der ε- Aminogruppe von Lysin und der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyrosin ausbildet, untersucht werden. Als Modellsystem diente hierzu $(L\text{-}Lys)_n$, welches mit Chlorphenolen variabler Acidität bedampft wurde.
Es war zu erwarten, daß je nach Acidität des jeweiligen Phenols unterschiedliche Lagen des Protontransfergleichgewichtes $Lys\text{-}NH_2...HO\text{-}Ph \rightleftharpoons Lys\text{-}NH_3^+...^-O\text{-}Ph$ beobachtet würden. Das auf diese Weise untersuchte Symmetrieverhalten wurde dann anschließend mit dem der $(L\text{-}Lys)_n$+$(L\text{-}Tyr)_n$-Brücken verglichen.
Die untersuchten Kombinationen sind in Tabelle 3.1. zusammen mit dem zugehörigen pk_a-Wert bzw. Δpk_a-Wert, der gemessenen Protontransferkonstanten K_t und dem entsprechenden Protontransfer PT aufgeführt.

Tabelle 3.1.

System	$pk_{a(Phenol)}$	Δpk_a	K_t	PT (%)
$(L\text{-}Lys)_n$ + $1^{(x)}$	9.9[a]	0.5	0.093	8.5
" + 2	8.9[b]	1.6	0.482	32.5
" + 3	8.6[c]	1.9	0.887	47.0
" + 4	7.7[b]	2.8	3.34	77.0
" + 5	7.3[b]	3.2	∞	100
" + 6	5.3[b]	5.2	∞	100

a :(Lit. 22)
b :(Lit. 69)
c :(Lit. 23)

(x)
1 : Phenol
2 : 3-Chlorphenol
3 : 3,4-Dichlorphenol
4 : 2,4,5-Trichlorphenol
5 : 2,3,5-Trichlorphenol
6 : Pentachlorphenol

In Abbildung 3.1. a-f) sind die zugehörigen Spektren gezeigt und als Vergleich dazu in Abbildung 3.1. g-h) die Spektren der freien Polybase $(L\text{-Lys})_n$ (durchgezogen) und der protonierten Spezies $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$ (gestrichelt).

3.1.1.2. Indizien für vollständige Brückenbildung:

Folgende Kriterien konnten für den Nachweis der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen $(L\text{-Lys})_n$ und Phenolen herangezogen werden:

- Die γ_{OH}-Schwingung von unassoziiertem Phenol liegt im Bereich um 3600 cm^{-1}.(Lit.70)
  Eine Bande, welche charakteristisch für diese Schwingung ist, wird jedoch in den Spektren der wasserfreien Assoziate nicht beobachtet, wie aus Abb. 3.1. ersichtlich ist.
  Hieraus ist zu schließen, daß in den wasserfreien Filmen quantitative Ausbildung von Wasserstoffbrücken erfolgt ist.
  Die Bildung dieser Brücken wird stattdessen in den Spektren a-f) durch eine breite Bande mit Maximum bei etwa 2550 cm^{-1} und weitem Ausläufer nach kleinen Wellenzahlen angezeigt. Diese Bande rührt von der Fundamentalschwingung des Brückenprotons her, und wird anschließend bei der Diskussion der Symmetrie der Brücken noch näher betrachtet.

- Als weiteres Kriterium dient die Verschiebung einer phenolspezifischen Schwingung mit starkem Deformationscharakter der OH-Gruppe zu höheren Wellenzahlen bei Ausbildung von Wasserstoffbrücken.(Lit.15) Diese Schwingung wird im folgenden mit δ_{OH} bezeichnet.
  Evans (Lit.71) fand z.B. eine Verschiebung dieser Schwingung von 1179 cm^{-1} nach 1228 cm^{-1} beim Übergang vom unassoziierten Phenol in verdünnter Lösung zur über O...H...O- Brücken assoziierten Spezies im festen Zustand.
  Die in den vorliegenden Systemen beobachteten Bandenlagen der erwähnten Schwingung bei verschiedenen $(L\text{-Lys})_n$/Phenolkombinationen sind in Tabelle 3.2. zusammengestellt.

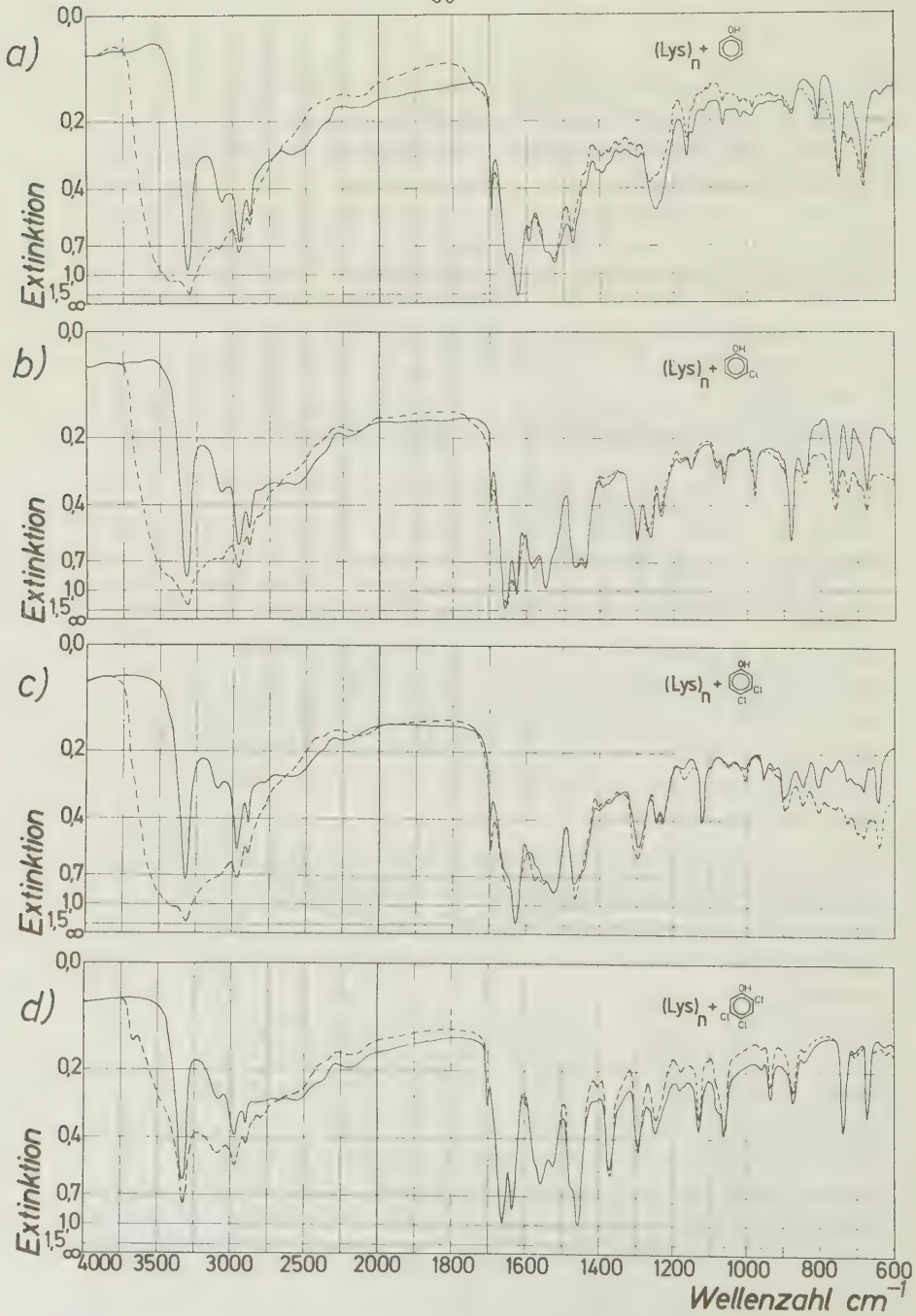


Abbildung 3.1. a – d

(Erläuterungen siehe Seite 38)

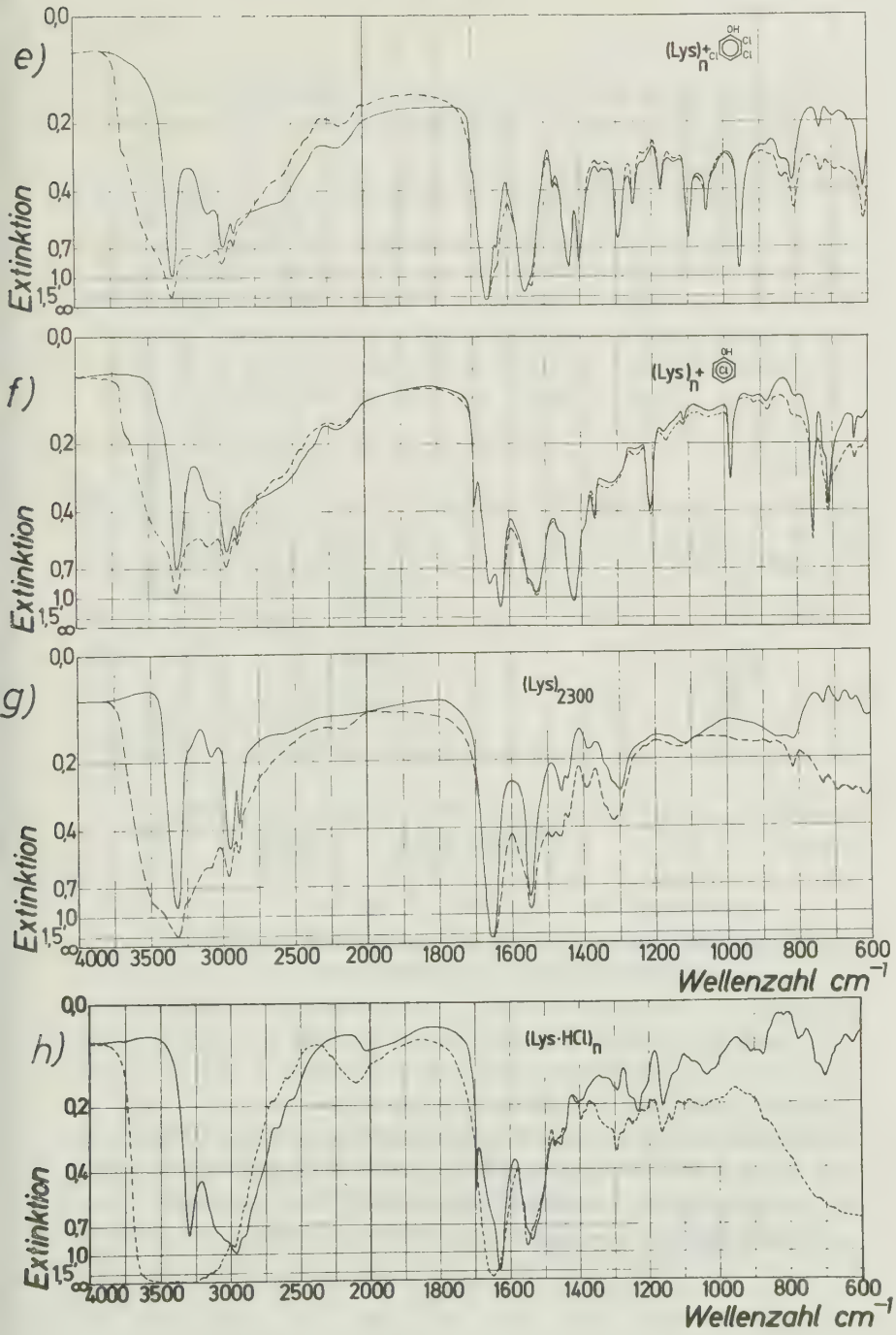


Abbildung 3.1. e – h ; (Erläuterungen siehe Seite 38)

Erläuterungen zu den Spektren von $(L\text{-Lys})_n$ mit Phenolen in Abb.3.1.:

a) $(L\text{-Lys})_n$ + Phenol
b) $(L\text{-Lys})_n$ + 3-Chlorphenol
c) " + 3,4-Dichlorphenol
d) " + 2,4,5-Trichlorphenol
e) " + 2,3,5-Trichlorphenol
f) " + Pentachlorphenol
g) $(L\text{-Lys})_n$
h) $(L\text{-Lys HCl})_n$

(——): wasserfreier Film
(- - -) : hydratisierter Film

Tabelle 3.2.

System	$\delta_{OH...N}$ (Komplex) (cm^{-1})	$\delta_{OH...O}$ (in Nujol) (cm^{-1})	$\Delta\delta$ (cm^{-1})
$(Lys)_n$ +	1245, 1230sh	1230	15
" +	1255	1200	55
" +	1290	1220	70

Lage der δ_{OH}-Schwingung in verschiedenen $(L\text{-Lys})_n$/Phenol-Komplexen.

Aus Tabelle 3.2. ist ersichtlich, daß im$(L\text{-Lys})_n$ + Phenol-Assoziat im getrockneten Zustand die δ_{OH}-Bande bei 1245 cm^{-1} mit einer schwachen Schulter bei 1230 cm^{-1} erscheint, während für eine Suspension von Phenol in Nujol, wo Assoziation über OH...O- Brücken vorliegt, das Bandenmaximum bei 1230 cm^{-1} beobachtet wurde. Die Verhältnisse sind in Abbildung 3.2. dargestellt. Demzufolge kann aus der 1245 cm^{-1}-Bande und der schwachen Schulter bei 1230 cm^{-1} auf die überwiegende Ausbildung von OH...N - Brücken und einen sehr geringen Anteil an über OH...O - Brücken selbstassoziiertem Phenol geschlossen werden.

Ähnliche Verschiebungen der δ_{OH}-Schwingung im Vergleich zu den reinen Chlorphenolen konnten auch in den beiden Systemen $(L\text{-Lys})_n$+ + 3-Chlorphenol und $(L\text{-Lys})_n$+ 3,4-Dichlorphenol beobachtet werden, wobei in diesen Fällen keine Schulter auf Selbstassoziation des jeweiligen Phenols hinweist.
Damit kann die Existenz von nicht an die Lysinreste gebundenem Phenol ausgeschlossen werden.
Die beschriebenen Banden der Kombination $(L\text{-Lys})_n$+Phenol sind in Abbildung 3.2. zu sehen, während in Tabelle 3.2. die Bandenlagen aller drei erwähnter Assoziate aufgeführt sind.

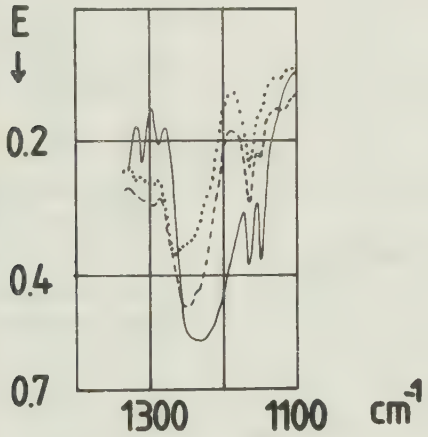
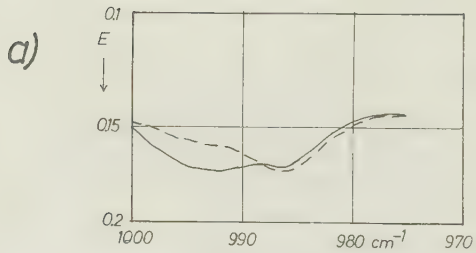
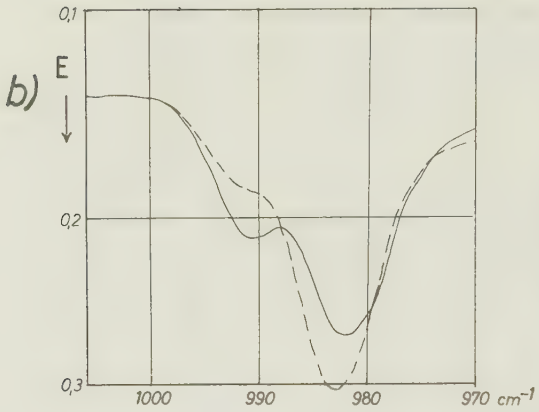
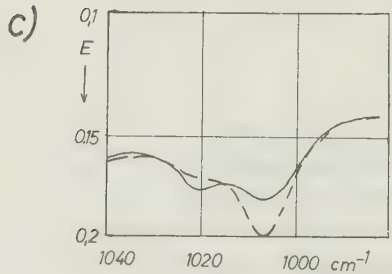


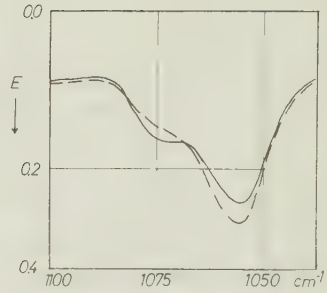
Abbildung 3.2. : Lage der δ_{OH}-Schwingung im $(L\text{-Lys})_n$+Phenol-Assoziat (- - -) im Vergleich zur Lage im selbstassoziierten Phenol im Nujolspektrum (———)
(...) : $(L\text{-Lys})_n$+Phenol im hydratisierten Zustand

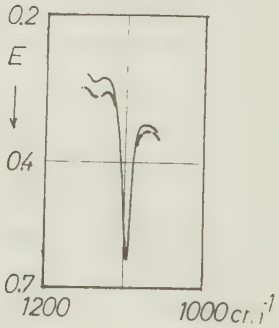
Das aus Tabelle 3.2. ersichtliche, von Phenol zu 3,4-Dichlorphenol zunehmende Ausmaß der Verschiebung $\Delta\delta$ ergibt darüberhinaus ein qualitatives Maß für die Zunahme der Bindungsenergie der Wasserstoffbrücke zwischen ε-Aminogruppe und zunehmend aciderem Phenol.











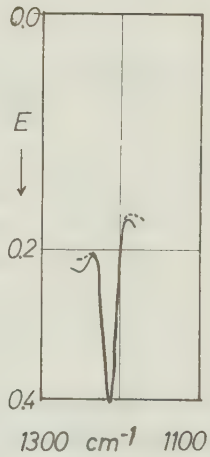


Abbildung 3.3. Protontransferbanden der $(L\text{-}Lys)_n$+ Chlorphenolassoziate:
——— trockener Film
- - - - hydratisierter Film

a) $(Lys)_n$+Phenol ; b) $(Lys)_n$+ 3-Chlorphenol
c) $(Lys)_n$+ 3,4-Dichlorphenol
d) $(Lys)_n$+ 2,4,5-Trichlorphenol
e) $(Lys)_n$+ 2,3,5-Trichlorphenol
f) $(Lys)_n$+ Pentachlorphenol

Bei den Assoziaten mit größerem Δpk_a, nämlich 2,3,5 - und 2,4,5-Trichlorphenol mit $(L\text{-}Lys)_n$, bei denen - wie im folgenden gezeigt- hoher oder vollständiger Protontransfer eintritt, war die δ_{OH^-}-Schwingung naturgemäß nur sehr schwach oder überhaupt nicht mehr vorhanden.
Gleiches gilt natürlich für die Assoziate mit Pentachlorphenol.

Eine Dissoziation der Protontransferspezies in isolierte Ionen gemäß dem Gleichgewicht $(O^-...HN^+)_s \rightleftharpoons (O^-)_s + (HN^+)_s$ kann in den getrockneten Filmen ausgeschlossen werden, da keine Solvatation durch polares Solvens möglich ist.
Auf den Einfluß der Hydratation hinsichtlich dieses Gesichtspunktes wird in Abschnitt 3.1.1.4. eingegangen werden.

3.1.1.3. Größe der Transferkonstanten K_t bzw des Protontransfers PT

Das Auswerteverfahren mittels spezifischer Phenol- bzw Phenolat- Banden ist im experimentellen Teil in Abschnitt 2.6.4. beschrieben.
Abbildung 3.3. zeigt die entsprechenden, zur Auswertung herangezogenen gedehnten Banden der Assoziatfilme.
Dabei repräsentiert die durchgezogen gezeichnete Bande jeweils die Verhältnisse im getrockneten Zustand, während die gestrichelten Banden von hydratisierten Filmen stammen.

Die auf diesem Weg erhaltenen Meßergebnisse sind in Tabelle 3.1. aufgeführt und in Abbildung 3.4. graphisch dargestellt.

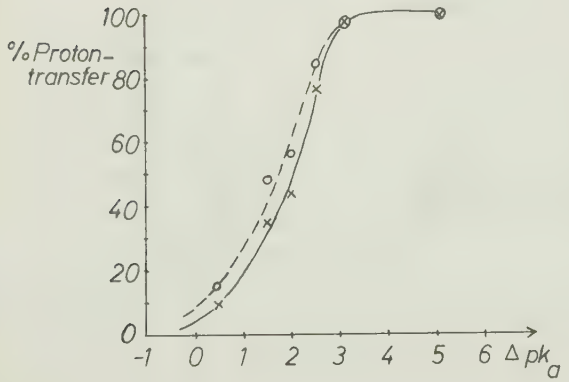


Abbildung 3.4.

Protontransfer im System $(Lys)_n$ + Phenole

Die durchgezogene Linie in Abbildung 3.4. zeigt die Abhängigkeit des Protontransfers PT (in %) vom Δpk_a in den getrockneten Systemen.

Der sich über ca. 4 pk_a - Einheiten erstreckende, relativ flache Kurvenverlauf ist typisch für Systeme, in denen keine Aufsteilung der Transferkurve dadurch eintritt, daß Protontransfer und eine kooperative Konformationsänderung des Peptidrückgrates gekoppelt sind, wie dies z.B. für die Kombination von $(L\text{-His})_n$ mit Carbonsäuren (Lit.11) berichtet wurde, und im System $(L\text{-Cys})_n$ mit N-Basen in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde.(Vergleiche Abschnitt 3.2.1.)

Der Punkt mit 50 % Protontransfer, d.h., der Punkt, an dem die beiden Grenzstrukturen $OH\ldots N \rightleftharpoons O^-\ldots HN^+$ gleiches Gewicht besitzen, und somit die Brücke im Mittel symmetrisch ist, liegt bei einem Δpk_a von 1,9 in den getrockneten Systemen.
An diesem Punkt besitzt die (L-Lys) / Phenol-Wasserstoffbrücke ihre maximale Polarisierbarkeit.(Lit.72)

Im vorliegenden $(L\text{-Lys})_n$ + Phenole - System erwies sich eine Auswertung der kontinuierlichen Absorption als unmöglich, da aus technischen Gründen nur Filme mit relativ geringer Schichtdicke (10 µVal) hergestellt werden konnten.
Aus Untersuchungen an Propylamin - Phenol-Systemen ist jedoch bekannt, daß die maximale Intensität der Kontinua im Bereich der im Mittel symmetrischen Phenol-Amin-Brücken liegt.(Lit.73)

In Abbildung 3.5. sind die beschriebenen Ergebnisse in Form eines sog. Huyskens-Plots aufgetragen.(vergleiche Abschnitt 2.6.5.)

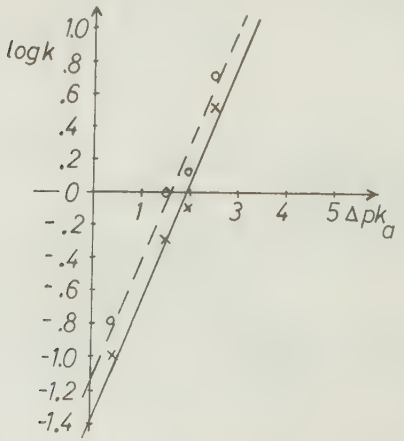


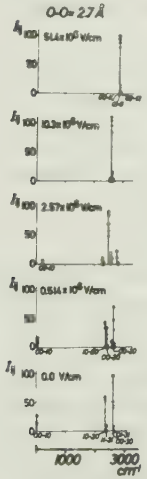
Abbildung 3.5.

Huyskens-Plot des Systems $(L\text{-Lys})_n$ + Phenole

Die Kreuze repräsentieren dabei die Messpunkte der wasserfreien Systeme und liegen im Rahmen der Messgenauigkeit auf einer Geraden, die durchgezogen gezeichnet ist.
Der Schnittpunkt mit der Abszisse (log K_t = 0) liefert für den Symmetriepunkt ebenfalls einen Δpk_a- Wert von 1,9.

In der Reihe der untersuchten Systeme verlagert sich mit zunehmender Acidität des Phenols die tiefere Mulde des Protonpotentials vom Phenol zum Amin, wobei etwa bei der Kombination von $(L\text{-Lys})_n$ mit 3,4-Dichlorphenol ein im Mittel symmetrisches Doppelminimumpotential durchlaufen wird.
Kristallographische Ergebnisse zeigen, daß Phenol-Amin-Wasserstoffbrücken relativ große Bindungslängen besitzen.(2.7 - 2.9 A) (Lit.74)

Abbildung 3.6. zeigt errechnete Strichspektren für relativ lange Wasserstoffbrücken mit Protonpotentialen, wie sie in den untersuchten Brücken vorliegen, d.h., Doppelminima mit einem relativ hohen Wall.(Lit.72)



Die errechneten Strichspektren in Abbildung 3.6. sind in Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke an der Brücke, d.h. in Abhängigkeit vom Grad der Unsymmetrie aufgetragen.
In der totalsymmetrischen Brücke (0,0 V/cm) findet man im Bereich um 2500 cm^{-1} die Protonenübergänge 1-2 und 0-3.
Mit zunehmender Unsymmetrie kommt zunächst der Übergang 0-2 hinzu. Betrachtet man eine Verteilung von Feldstärken, wie sie in einem amorphen System vorliegt, so verflies- →

Abbildung 3.6. : Errechnete Strichspektren mit einer Brückenlänge von 2,7 A bei verschiedenen Feldstärken (nach Lit. 72)

sen diese Übergänge zu einer breiten Bandenstruktur in diesem Bereich, wie sie von Hayd (Lit.29) berechnet wurde und in Abbildung 3.7. gezeigt ist.

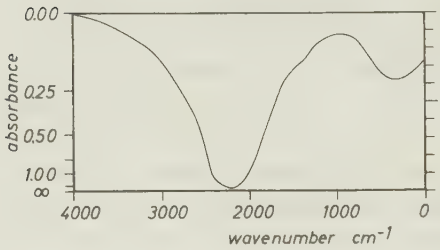


Abbildung 3.7. : Berechnete Kontinuumsabsorbtion bei einer Brückenlänge von d_{O-O} =2,7 A (nach Lit.29)

In dieser Weise kommt das beobachtete Absorptionsmaximum bei etwa 2550 cm^{-1} in den Spektren der $(Lys)_n$+Phenolassoziate zustande. (Vergleiche Abbildung 3.1.a-f)
Werden schließlich die Brücken so unsymmetrisch, daß die beiden untersten Protonenniveaus 0 und 1 nur noch in einer der beiden Potentialmulden liegen, dann werden, wie Abbildung 3.6. bei hohen Feldstärken zeigt, die Verhältnisse nur noch durch den Übergang 0-1 bestimmt, der zudem etwas nach höheren Wellenzahlen verschoben ist.
Eine derartige Verschiebung wird im System $(L\text{-Lys HCl})_n$ beobachtet, wo ein sehr unsymmetrisches Potential bei den realisierten $NH^+...Cl^-$ - Brücken vorliegt.
Die entsprechende Bande von $(L\text{-Lys HCl})_n$ ist in durchgezogener Linie in Abbildung 3.1.h gezeigt,und erstreckt sich von etwa 3150 cm^{-1} nach 2500 cm^{-1}.
Bei Hydratation (gestrichelt in Abbildung 3.1.h) verschwindet diese Bande infolge Aufbrechens der $NH^+...Cl^-$ - Brücken.

3.1.1.4. Einfluß der Hydratation :

3.1.1.4.1. Hydratation von $(L\text{-Lys})_n$-Filmen :

In Abbildung 3.1.g ist gestrichelt ein bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit hydratisierter $(L\text{-Lys})_n$-Film im Vergleich zum Spektrum der getrockneten Substanz (durchgezogen) abgebildet. Messungen mit der Adsorptionswaage bei ebenfalls 90 % rel. Luftfeuchtigkeit zeigten, daß pro Lysinrest 3,1 Moleküle Wasser angelagert werden. Dieser Wert liegt um etwa 25 % niedriger als der von Breuer (Lit.75) gefundene Wert, ist aber in guter Übereinstimmung mit einer Hydratationszahl von 3,0 , die Oakes (Lit.76) für die Lysin-Reste von Serumalbumin erhielt.
Deutlich ist im IR-Spektrum des hydratisierten $(L\text{-Lys})_n$-Filmes die breite OH-Valenzschwingung des angelagerten Wassers, welche von der Amid A - Bande überlagert wird, zu sehen.
Weiterhin taucht im Bereich der Amid-I-Bande etwas unterhalb von 1650 cm^{-1} -ersichtlich als Verbreiterung der Amid-I-Bande- die Scherenschwingung und bei 700 cm^{-1} die Torsionsschwingung des Wassers auf.
Die Intensität der OH-Valenzschwingung erwies sich als qualitativ gutes Maß für die Menge an adsorbiertem Wasser in den Filmen von $(L\text{-Lys})_n$ mit Chlorphenolen.

3.1.1.4.2. Hydratation von $(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenolfilmen :

- Adsorbierte Wassermenge

Aus den gestrichelten Spektren in Abbildung 3.1.a-g) ist ersichtlich, daß die Wasseraufnahme der Filme mit den hydrophilen Phenolen (Phenol, 3-Chlorphenol, 3,4-Dichlorphenol) bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit sogar noch etwas über dem Ausmaß der reinen $(L\text{-Lys})_n$-Filme liegt.
Dagegen ist die Hydratisierung der mit hydrophoben Phenolen (2,4,5-Trichlorphenol, Pentachlorphenol) bedampften Filme wesentlich kleiner, nämlich näherungsweise 1-2 Wassermoleküle pro Lysinrest.

- Einfluß auf den Protontransfer

Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde, (Lit.77, 78, 79, 12) vermag Zusatz von polaren Lösungsmitteln und insbesondere von Wasser das Protontransfergleichgewicht zugunsten der polaren Grenzstruktur zu verschieben.
Auch im vorliegenden System verschiebt sich die Protontransferkurve nach einem kleineren Δpk_a-Wert. (siehe Abbildung 3.4. und 3.5. jeweils gestrichelt gezeichnet)
Wie im folgenden gezeigt, begünstigt jedoch Hydratation auch Dissoziation der Brücken.
Von Vinogradov (Lit.1) wurde nämlich durch Leitfähigkeitsmessungen an verschiedenen Ammoniumpikraten in Dioxan/Wasser-Gemischen gezeigt, daß zunehmender Hydratationsgrad die Dissoziation der Wasserstoffbrücken begünstigt. Weiterhin zeigte er, daß dieser Effekt besonders bei solchen Assoziaten ausgeprägt ist, bei denen überwiegend die polare Grenzstruktur vorliegt.

Ein Vergleich der gestrichelt gezeichneten mit den in ausgezogener Linie dargestellten Spektren in Abbildung 3.1.a-f zeigt, daß die breite, oben bereits diskutierte Bande um 2550 cm^{-1} mit zunehmender Hydratation in ihrer Intensität beträchtlich abnimmt.

Hiernach bewirkt - wie erwartet - Hydratation eine Öffnung der Wasserstoffbrücken, was sich in einer Abnahme der Assoziationskonstanten K_a und einer Zunahme der Dissoziationskonstanten K_d niederschlägt, entsprechend dem folgenden Schema:

$$(A\text{-}H)_s + (B)_s \underset{}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} (A\text{-}H\ldots B)_s \overset{K_t}{\rightleftharpoons} (A^-\ldots HB^+)_s \overset{K_d}{\rightleftharpoons} (A^-)_s + (HB^+)_s$$

Eine Betrachtung der bereits in Abschnitt 3.1.1.2. diskutierten phenolischen Deformationsschwingung δ_{OH} des $(L\text{-}Lys)_n$+ +Phenol-Assoziates zeigt, daß bei Hydratation (Abbildung 3.2. punktiert) eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 1245 cm^{-1} im trockenen Komplex nach 1260 cm^{-1} eintritt.
Dies deutet auf die Ausbildung von Phenol-Wasser-Brücken hin.
Bei 1245 cm^{-1} verbleibt jedoch eine Schulter, die zeigt, daß in diesem System auch bei Anwesenheit von etwa 4 H_2O pro Lysinrest

keine vollständige Dissoziation der $(L\text{-Lys})_n$/Phenol-Wasserstoffbrücken eintritt.
Ein ähnliches Verhalten der Deformationsschwingung wird auch in den Systemen von $(L\text{-Lys})_n$ mit 3- und 3,4-Dichlorphenol beobachtet. Dies ist in Abbildung 3.8. gezeigt.

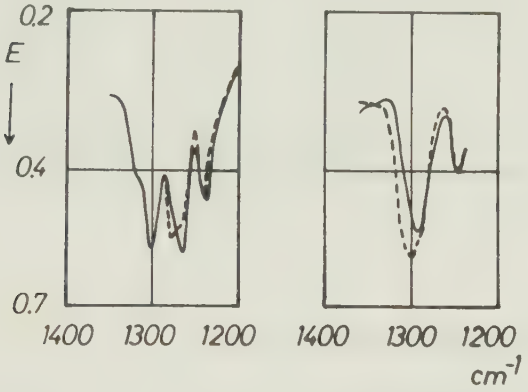


Abbildung 3.8. : Verschiebung der δ_{OH}-Schwingung in den Assoziaten mit $(L\text{-Lys})_n$ bei Hydratation
(——): wasserfreier Film
(- - -): nach Hydratation über 90 % rel. Luftfeuchte
linkes Bild: $(L\text{-Lys})_n$ + 3-Chlorphenol
rechtes Bild: $(L\text{-Lys})_n$ + 3,4-Dichlorphenol

Aus Abbildung 3.8. ist ersichtlich, daß im Assoziat mit 3-Chlorphenol bei Hydratation eine Verschiebung des Bandenmaximums von 1255 nach 1265 cm^{-1} erfolgt, was eine Öffnung der Wasserstoffbrücken anzeigt.
Daneben deutet aber eine verbleibende Schulter bei 1255 cm^{-1} - wie oben bei Phenol - auf einen Restanteil an erhalten gebliebenen OH...N-Brücken hin.
Für das Assoziat mit 3,4-Dichlorphenol gilt analoges. Die Verschiebung erfolgt hier von 1290 nach 1300 cm^{-1} mit verbleibender Schulter bei 1290 cm^{-1}.

Der Sachverhalt, daß im Falle der Kombination von $(L\text{-Lys})_n$ mit Pentachlorphenol im hydratisierten Zustand die Bande mit Maximum bei 2550 cm^{-1} erhalten bleibt (Abbildung 3.1. f), obwohl vollständiger Protontransfer vorliegt, steht nicht im Gegensatz zu dem oben erwähnten Befund von Vinogradov (Lit.1), daß bei überwiegend vorliegender polarer Grenzstruktur die lösungsmittelbedingte Dissoziation besonders begünstigt ist.
Dies zeigt die Betrachtung der Intensität der ν_{OH}-Valenzschwingung des gebundenen Wassers in Abbildung 3.1.f).
Wie bereits erwähnt, beträgt der Hydratationsgrad in diesem System nur etwa 1/3 des Wertes vom $(L\text{-Lys})_n$+Phenol-System, womit das relativ geringe Ausmaß der Dissoziation im Pentchlorphenol-Assoziat auf die geringere Hydratation zurückzuführen ist.

3.1.1.5. Konformation des Peptidrückgrates :

Informationen hierüber wurden aus der Lage der verschiedenen Amid-Banden gewonnen. (siehe Methodischer Teil 2.6.1.)

- Filme der freien Polybase $(L\text{-Lys})_n$:

Reversible Konformationsänderungen zwischen α-Helix und antiparalleler β-Struktur, wie sie in den Filmen der Hydrohalidsalze $(L\text{-Lys HCl})_n$ und $(L\text{-Lys HBr})_n$ in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad von verschiedenen Autoren beobachtet wurden (Lit. 9, 80), konnten im Falle der freien Polybase nicht festgestellt werden.
Stattdessen beeinflußt jedoch die Kettenlänge n die auftretende Konformation, wie Abbildung 3.9. zu entnehmen ist.
Dort ist in durchgezogener Linie das Spektrum eines $(L\text{-Lys})_n$-Filmes mit großer Kettenlänge (n = 2286) gezeigt, während das gestrichelte Spektrum von einer relativ kurzkettigen Probe stammt. (n = 192)
Deutlich ist die unterschiedliche Lage der verschiedenen Amid-Banden zu erkennen, deren genaue Positionen in Tabelle 3.3. aufgeführt sind.

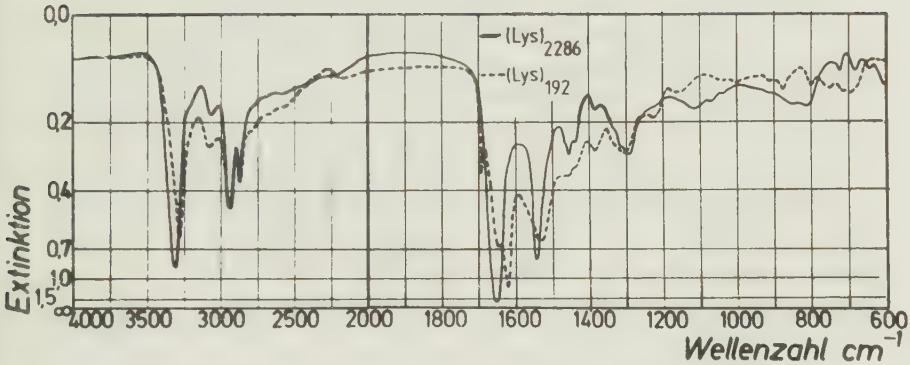


Abbildung 3.9. : Abhängigkeit der Konformation von $(L\text{-Lys})_n$-Filmen von der Kettenlänge n

(———) : n = 2286

(- - -) : n = 192

Tabelle 3.3. :

Kettenlänge n	Konformation	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})
2286	α-Helix	3292	1650	1544
192	antiparallel β	3271	1623, 1692	1535

Aus den Bandenlagen ist eindeutig zu entnehmen, daß langkettige $(L\text{-Lys})_n$-Filme in helikaler Konformation vorliegen, während kurzkettige Filme die β - Konformation bevorzugen.
Hierbei ist jedoch zu erwähnen, daß auch Filme des kurzkettigen Polymeren nach dem Eintrocknen zunächst in α-Helix vorliegen und erst nach längerem Hydratisieren bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit irreversibel in die antiparallele β-Struktur übergehen. Filme des langkettigen Polymeren behalten dagegen unter analogen Bedingungen die helikale Konformation bei.

- Filme der $(L\text{-Lys})_n$ + Chlorphenol-Assoziate :

Bei allen Untersuchungen fand Poly-L-Lysin der Kettenlänge n = 192 Verwendung, welches - wie oben gezeigt - eine Bevorzugung der antiparallelen β-Struktur aufweist.
Eine Betrachtung der konformationstypischen Amid-Banden in den Assoziatspektren in Abbildung 3.1. a-f) zeigt, daß kein systematischer Zusammenhang zwischen zunehmendem Protontransfer und der Bevorzugung einer bestimmten Konformation besteht, so wie dies z.B. im $(L\text{-His})_n$/Carbonsäuresystem (Lit.11) der Fall war. Jedoch zeigte sich stets - ebenso wie in den reinen $(L\text{-Lys})_n$-Filmen - nach längerem Hydratisieren eine Bevorzugung der β - Konformation.

3.1.2. Statistisches Copolymeres copoly$(L\text{-Lys, L-Tyr})_n$:

Die Herstellung der Filme erfolgte aus copoly$(L\text{-Lys}\cdot HBr, L\text{-Tyr})_n$, wie im Abschnitt 2.3.2.10. beschrieben.

3.1.2.1. Indizien für Brückenbildung :

Wie bei den $(L\text{-Lys})_n$ / Phenol-Systemen konnten für den Nachweis der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Lysin- und Tyrosinresten in der HBr-freien Substanz folgende Kriterien herangezogen werden:

- Der Vergleich der in Abbildung 3.10. gezeigten Spektren von copoly$(L\text{-Lys}\cdot HBr, L\text{-Tyr})_n$ (- - -) und copoly$(L\text{-Lys, L-Tyr})_n$ (——) jeweils im wasserfreien Zustand zeigt, daß im Hydrobromid (- - -) im Bereich zwischen 3100 und 2900 cm^{-1} eine breite Absorption auftritt, welche in analoger Weise auch im Spektrum von $(L\text{-LysHCl})_n$ beobachtet wurde (vergleiche Abbildung 3.1. h) und in Abschnitt 3.1.1.3. diskutiert wurde. Dort wurde diese Bande dem Protonenübergang O-1 in einer sehr unsymmetrischen Wasserstoffbrücke zugeschrieben.

In Übereinstimmung hiermit ist die Zuordnung von Sandorfy (Lit.3) an Spektren von Amin-Hydrohaliden.
Naturgemäß fehlt diese Bande im Spektrum des HBr-freien Copolymeren, wie das durchgezogene Spektrum in Abbildung 3.10. zeigt. Stattdessen erscheint - ähnlich wie bei den $(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenolsystemen - eine breite, für OH...N - Brückenbildung charakteristische breite Absorption bei etwa 2550 cm^{-1}.
Darüberhinaus erkennt man deutlich eine schwache kontinuierliche Absorption, die sich, beginnend bei der obig erwähnten Bande, nach kleinen Wellenzahlen erstreckt.

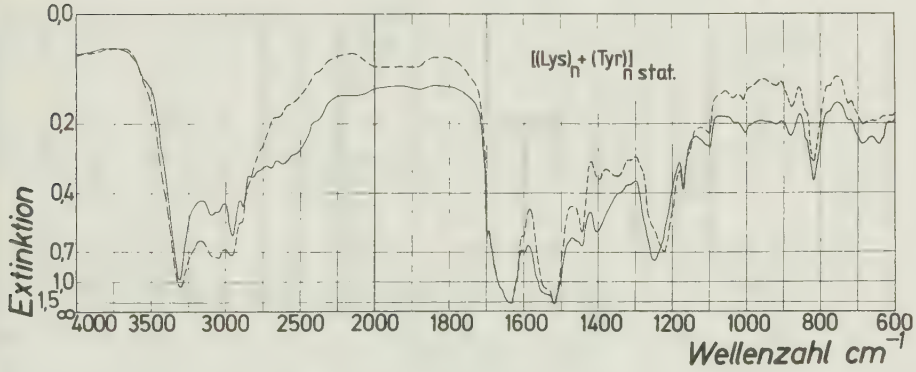


Abbildung 3.10. : (——) : copoly(L-Lys, L-Tyr)$_n$ 1:1
(- - -): copoly(L-Lys·HBr, L-Tyr)$_n$ 1:1

- Wie im Falle der $(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenolsysteme kann auch hier die Verschiebung der OH - Deformationsschwingung des Tyrosinrestes nach hohen Wellenzahlen als Indikator für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken benützt werden.
Wie aus Abbildung 3.11. ersichtlich ist, beträgt die Verschiebung vom bei 1222 cm^{-1} absorbierenden unassoziierten HBr-haltigen Copolymeren zur HBr-freien Form, die bei 1248 cm^{-1} absorbiert, 26 cm^{-1}. (Vergleiche auch Tabelle **3.5.**)
Aus der Anwesenheit einer schwachen Schulter bei 1222 cm^{-1} an der 1248 cm^{-1}-Bande des copoly(L-Lys, L-Tyr)$_n$-Komplexes (Abbildung 3.11.a , durchgezogen) kann auf das Vorliegen eines geringfügigen

Restanteils von unassoziierten Tyrosinresten geschlossen werden. Eine Abschätzung der Intensität der Schulter ergab jedoch weniger als 10 % unassoziierte Reste.

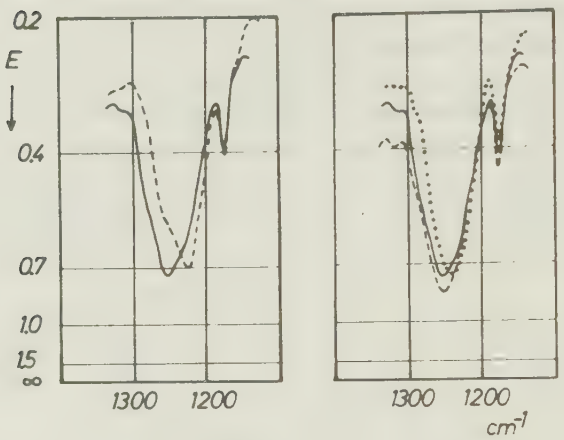


Abbildung 3.11. a) b)

a) : δ_{OH}-Schwingung des (L-Lys, L-Tyr)$_n$-Copolymeren
(——) : HBr-freie Substanz
(- - -): HBr-haltige Substanz

b) : Hydratationsabhängigkeit der δ_{OH}-Schwingung der HBr-freien Substanz
(——) : wasserfreier Film
(- - -) : nach Hydratation über 90 % rel. Luftfeuchigkeit
(. . .) : zum Vergleich: hydratisierter copoly(L-Lys·HBr, L-Tyr)$_n$-Film

3.1.2.2. Lage des Protontransfergleichgewichtes :

Abbildung 3.12.a) zeigt die Verschiebung einer aromatischen Ringschwingung der Seitengruppe von Poly-L-Tyrosin beim Übergang zum polymeren Natriumsalz (L-Tyr$^-$Na$^+$)$_n$ von 1513 cm^{-1} nach 1497 cm^{-1}. Anhand des Intensitätsverhältnisses dieser Banden wurde im Spektrum

des HBr-freien Copolymeren die Lage des Protontransfergleichgewichtes in der $OH...N \rightleftharpoons O^{-}...HN^{+}$ - Brücke bestimmt.
In Abbildung 3.12. b) ist die entsprechende Bande eines copoly-$(L\text{-Lys, L-Tyr})_n$-Spektrums im Vergleich zum Spektrum eines HBr-haltigen Filmes, wo keine Brückenbildung möglich ist, eingezeichnet.
An der sehr intensiven durchgezogenen Bande bei 1513 cm^{-1}, welche die unpolare Grenzstruktur anzeigt, befindet sich bei 1500 cm^{-1} eine schwache Schulter, die zeigt, daß auch der polaren Grenzstruktur merkliches Gewicht zukommt.

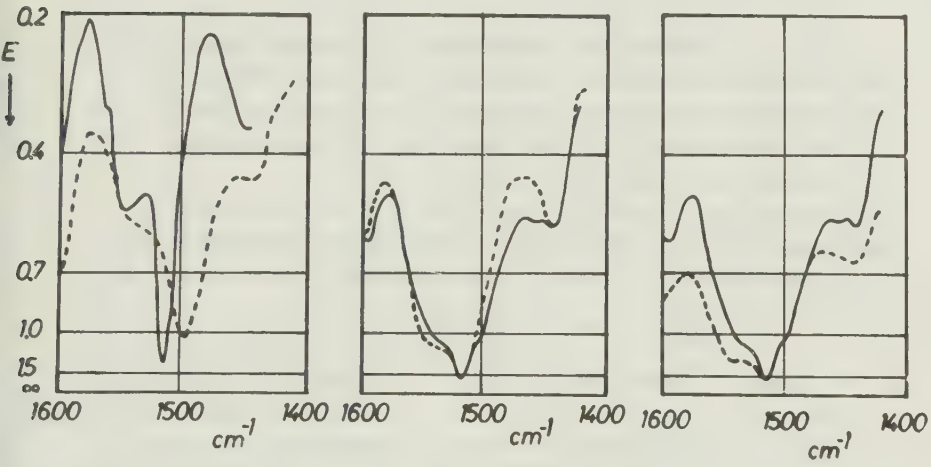


Abbildung 3.12. a) b) c)

a) : Zur Auswertung des Protontransfers herangezogene Banden von $(Tyr)_n$ (——) und von $(Tyr^{-}Na^{+})_n$ (- - -)

b) : Entsprechende Banden des HBr-freien Copolymeren (——) und des HBr-haltigen Copolymeren (- - -)

c) : Hydratationsabhängigkeit der Bande des HBr-freien Copolymeren
(——) : wasserfrei
(- - -): hydratisiert bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit

Die quantitative Auswertung der Schulter gestaltete sich infolge der geringen Intensität als sehr schwierig. Jedoch konnte durch Vergleich mit einem $(L\text{-}Tyr)_n$-Eichgemisch, welches 20 % $(L\text{-}Tyr^{-}Na^{+})_n$ enthielt, der Anteil an Protontransferspezies $-O^{-}...HN^{+}-$ zwischen 10 und 20 % ermittelt werden.
Dieser Wert stimmt gut überein mit dem in der Kombination $(L\text{-}Lys)_n$+ +Phenol erhaltenen Protontransfer von 9 %, was bei den vergleichbaren pk_a-Werten der Hydroxylgruppen von Phenol und Tyrosin auch zu erwarten ist.

3.1.2.3. Einfluß der Hydratation :

- Adsorbierte Wassermenge :

Die Assoziatfilme erwiesen sich im Gegensatz zu den HBr-haltigen Filmen als recht hydrophob und aus der Intensität der OH-Valenzschwingung des bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit angelagerten Wassers konnte auf einen Gehalt von 1-2 Wassermolekülen pro Säure-Base-Paar geschlossen werden.
In Abbildung 3.13. ist das Teilspektrum eines derartigen Filmes nach Hydratation (- - -) im Vergleich zum wasserfreien Zustand (——) gezeigt.

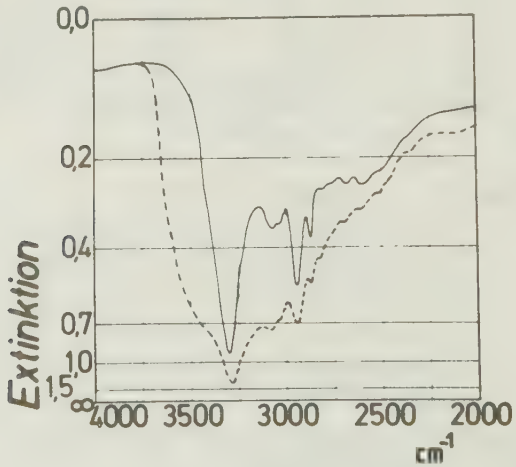


Abbildung 3.13. : Intensität der OH-Valenzschwingung des bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit an copoly(L-Lys, L-Tyr)$_n$ angelagerten Wassers (- - -) im Vergleich zum wasserfreien Zustand (——).

- Einfluß des Wassers auf die Dissoziation der Brücken :

Im Spektrum von hydratisiertem copoly(L-Lys, L-Tyr)$_n$ tritt keine Verschiebung der δ_{OH}-Deformationsschwingung der Tyrosinreste bei 1248 cm^{-1} ein, wie ein Vergleich der Bande im hydratisierten (- - -) und im getrockneten Zustand (———) in Abbildung 3.11. b) zeigt. (Vergleiche auch Tabelle 3.5.)
Ein Aufbrechen der Wasserstoffbrücken müßte eine Verschiebung der erwähnten Bande nach 1236 cm^{-1} zur Folge haben, wo das Absorptionsmaximum für die hydratisierte HBr-haltige Spezies liegt, in der Tyrosin-Wasser-Brücken realisiert sind.
Diese Bande ist in Abbildung 3.11. b) punktiert eingezeichnet. (Vergleiche auch Tabelle 3.5.)
Die erwähnten Beobachtungen deuten auf eine weitgehende Erhaltung der Wasserstoffbrücken zwischen Tyrosin- und Lysin-Seitengruppen bei einer Hydratation von 1-2 Wassermolekülen pro Säure-Base-Paar hin.

- Einfluß auf die Lage des Protontransfergleichgewichtes :

Im Rahmen der Messgenauigkeit ist bei Hydratation, wie die gestrichelte Bande in Abbildung 3.12. c) zeigt, keine Zunahme der Intensität der für die Protontransferspezies charakteristischen Schulter bei 1500 cm^{-1} zu beobachten.
Der Protontransfer nimmt also bei Zugabe von 1-2 Molekülen Wasser pro Säure-Base-Paar nicht zu.
Die ebenfalls in Abbildung 3.12. c) (- - -) ersichtliche, bei Hydratation intensiver auftretende Schulter bei 1540 cm^{-1} ist der Amid-II-Bande zuzuordnen.
Diese Bande zeigt auch in den Spektren von reinen (L-Tyr)$_n$-Filmen die erwähnte Hydratationsabhängigkeit ihrer Intensität und steht damit in keinem Zusammenhang mit einer Veränderung des Protontransfergleichgewichtes.

3.1.2.4. Konformation des Rückgrates :

Über die Lage der verschiedenen Amid-Banden gibt Tabelle 3.4. Auskunft.
Aus Lage und Intensität der Amid-I-Banden sowohl von HBr-haltiger

als auch von HBr-freier Spezies ist ersichtlich, daß in beiden Fällen vorzugsweise antiparallele β-Struktur vorliegt.
Die gleiche Konformation fanden auch andere Autoren (Lit.36) in wässriger Lösung.
Die Schulter bei 1652 cm^{-1} und die stark verbreiterte Amid-II-Bande zwischen 1530 und 1535 cm^{-1} deuten daneben auf einen geringen Anteil an Knäuel hin.

Tabelle 3.4. :

Substanz	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})	Konformation
copoly-(L-Lys·HBr, L-Tyr)$_n$	3275	1625, 1652 sh 1695	1530-35	β + wenig Knäuel
copoly-(L-Lys, L-Tyr)$_n$	3279	1625, 1652 sh 1695	1530-35	β + wenig Knäuel

Die Dominanz der antiparallelen β-Struktur bei der vorliegenden Kettenlänge von n = 220 korelliert gut mit den am (L-Lys)$_n$ gewonnenen Ergebnissen (vergleiche Abschnitt 3.1.1.5.), wo bei vergleichbaren Kettenlängen ebenfalls die β-Struktur überwog und erst wesentlich längere Polymere die α-Helix bevorzugten.
Daneben liegt (L-Tyr)$_n$ sowohl in Filmen (Lit. 4) als auch in Lösung (Lit.81) in bestimmten pH-Bereichen in antiparalleler β-Konformation vor.
Im vorliegenden System ist also an die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Protein-Seitengruppen keine konformative Umordnung hinsichtlich der unverbrückten Spezies gekoppelt.
Dies erscheint auch unnötig, da die β-Struktur eine - wie oben gezeigt wurde - annähernd vollständige Brückenbildung ermöglicht.

3.1.3. Poly-L-Lysin + Poly-L-Tyrosin :

Es wurden Polyaminosäuren der Kettenlängen n_{Lys} = 2286 und n_{Tyr} = 25 untersucht.

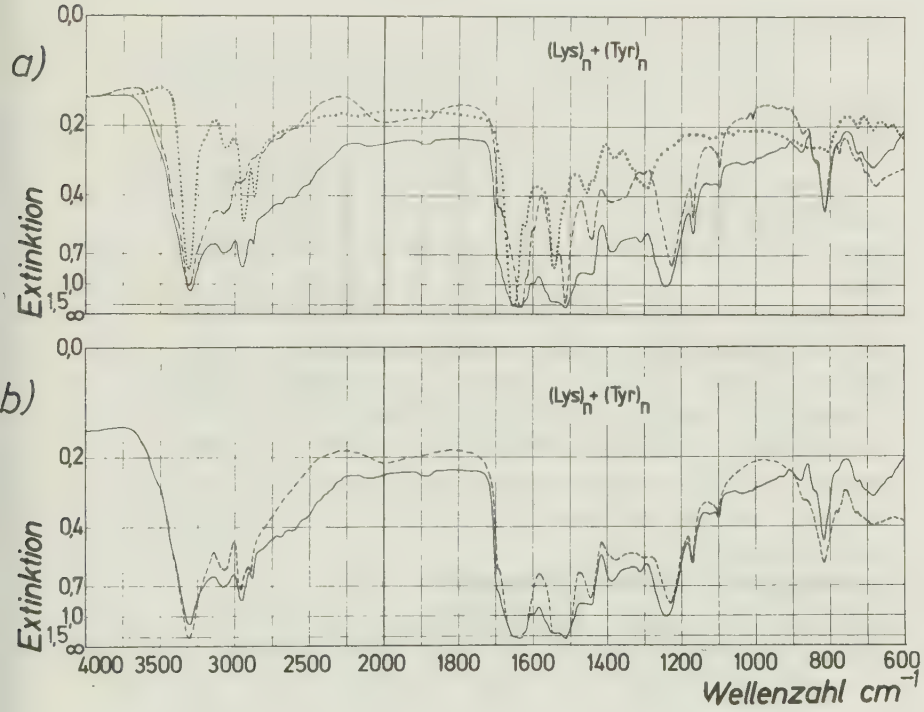


Abbildung 3.14. :

a) (———) : $(L\text{-Lys})_n + (L\text{-Tyr})_n$
(- - -): $(L\text{-Tyr})_n$
(. . .): $(L\text{-Lys})_n$

b) (———) : $(L\text{-Lys})_n + (L\text{-Tyr})_n$
(- - -): Summenspektrum von $(L\text{-Lys})_n$ und $(L\text{-Tyr})_n$ von Abb. 3.14. a)

Abbildung 3.14. a) zeigt die Spektren von $(L\text{-Lys})_n$ (. . .) und von $(L\text{-Tyr})_n$ (- - -) im Vergleich zum Spektrum des 1:1 - Komplexes von $(L\text{-Lys})_n$ und $(L\text{-Tyr})_n$, wobei gleiche Molmengen von Einzelkomponenten und Komplex anwesend sind.
In Abbildung 3.14. b) zeigt das gestrichelte Spektrum die Summe der Spektren von $(L\text{-Lys})_n$ und $(L\text{-Tyr})_n$ und das in ausgezogener Linie gezeichnete Spektrum wiederum den Komplex.

3.1.3.1. Indizien für Brückenbildung :

Die gleichen Indizien wie beim statistischen Copolymeren zeigen, daß sich auch hier Wasserstoffbrücken zwischen den Tyrosin-und den Lysin-Seitengruppen ausbilden, nämlich:

- Im Wellenzahlenbereich zwischen 3000 und 2200 cm^{-1} findet man, wie Abbildung 3.14. a) zeigt, eine breite Bande, die sich in einer kontinuierlichen Absorption nach kleinen Wellenzahlen fortsetzt.
- Es ist - ersichtlich aus Abbildung 3.14. b) - eine Verschiebung der δ_{OH}-Schwingung der Tyrosinseitengruppe von 1220 cm^{-1} im freien $(L\text{-Tyr})_n$ (- - -) nach 1248 cm^{-1} bei Komplexbildung (——) zu beobachten. (Vergleiche hierzu auch Tabelle 3.5.)

Im Gegensatz zum statistischen Copolymeren wird im vorliegenden Polymer + Polymer - Assoziatspektrum im Bereich der δ_{OH}-Schwingung keine Schulter bei 1222 cm^{-1} beobachtet, die auf unassoziierte Tyrosin-Reste hinweist.
Es findet also vollständige Brückenbildung statt.
In Abbildung 3.15. ist die δ_{OH}-Schwingung (- - -) im Vergleich zu derjenigen des statistischen Copolymeren (——) gezeigt.

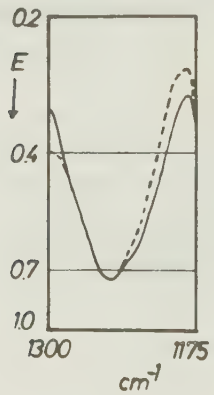


Abbildung 3.15. :
δ_{OH}-Schwingung der Tyrosin-Seitenreste in
(——): copoly(L-Lys,L-Tyr)
(- - -): $(L\text{-Lys})_n$ + $(L\text{-Tyr})_n$

3.1.3.2. Lage des Protontransfergleichgewichtes :

Im Spektrum von $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Tyr})_n$ in Abbildung 3.16. a) ist deutlich in durchgezogener Linie die der Protontransferspezies zuzuordnende Schulter bei 1500 cm^{-1} zu beobachten, ähnlich wie beim statistischen Copolymeren.
Zum Vergleich ist in Abbildung 3.16. a) punktiert die 1514 cm^{-1}-Bande von $(L\text{-Tyr})_n$ eingezeichnet.

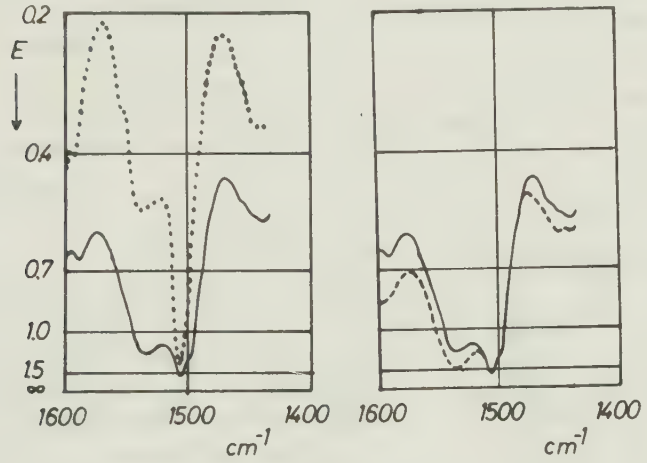


Abbildung 3.16. : a) b)

a) (----) : Bande zur Ermittlung des Protontransfers im $(L\text{-Lys})_n$ + $(L\text{-Tyr})_n$-Assoziat
(. . .): Entsprechende Bande von $(L\text{-Tyr})_n$

b) Hydratationsabhängigkeit des Protontransfers
(----) : wie in 3.16. a)
(- - -): Nach Hydratation über 90 % rel. Luftfeuchtigkeit

Die quantitative Auswertung der Intensität der erwähnten Schulter bei 1500 cm^{-1} lieferte ein Gewicht der polaren Grenzstruktur von etwa 10 % . Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem am Copolymeren gewonnenen Ergebnis , wo 10-20 % ermittelt wurden.

3.1.3.3. Einfluß der Hydratation :

- Adsorbierte Wassermenge :

Ebenso wie im Falle des Copolymeren läßt die Intensität der OH-Valenzschwingung des angelagerten Wassers in den Spektren des bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit hydratisierten Adduktes auf 1-2 Moleküle Wasser pro Säure-Base-Paar schließen.

- Einfluß auf die Dissoziation der Wasserstoffbrücken :

Wie beim analogen copolymeren System erfolgt auch hier keine Verschiebung der δ_{OH}-Schwingung der Tyrosin-Seitengruppe von 1248 cm^{-1} nach 1235 cm^{-1} bei Hydratation. Dies zeigt ein Vergleich von gestrichelt und durchgezogen gezeichneter Bande in Abbildung 3.17.

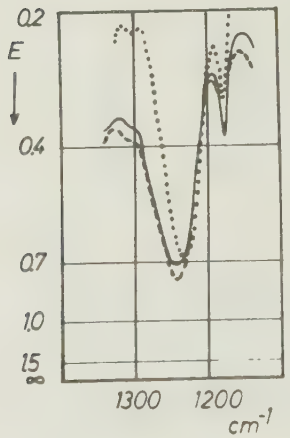


Abbildung 3.17. : Hydratationsabhängigkeit der δ_{OH}-Schwingung der Tyrosin-Seitengruppe im $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Tyr})_n$-Assoziat
(——) : getrocknet
(- - -): nach Hydratation über 90 % rel. Luftfeuchtigkeit
(....) : zum Vergleich die Bande von hydratisiertem $(L\text{-Tyr})_n$

Eine derartige Verschiebung wäre beim Aufbrechen der $O\text{-}H...N \rightleftharpoons O^{-}...H\text{-}N^{+}$ - Wasserstoffbrücken durch Anlagerung von Wassermolekülen zu erwarten, da in den Spektren von hydratisierten $(L\text{-Tyr})_n$- Filmen, wo zwischen der phenolischen OH-Gruppe der Tyrosin-Reste und dem angelagerten Wasser Wasserstoffbrücken vorliegen, die erwähnte Bande bei 1235 cm^{-1} erscheint. (Abbildung 3.17. punktiert)

Da keine derartige Bandenverschiebung im System $(L\text{-Lys})_n$+ $(L\text{-Tyr})_n$ beobachtet wird, kann geschlossen werden, daß die Wasserstoffbrücken zwischen Lysin- und Tyrosin-Resten bei Anwesenheit von 1-2 Molekülen Wasser pro Säure-Base-Paar erhalten bleiben.

In Tabelle 3.5. sind nochmals die Lagen der δ_{OH}-Schwingung der Tyrosin-Reste in allen besprochenen Systemen zusammengestellt. Wie bereits diskutiert, ist ersichtlich, daß die Tyrosin-Lysin-Wasserstoffbrücken bei der Hydratation mit 1-2 Molekülen Wasser sowohl im statistischen Copolymeren als auch im $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Tyr})_n$-Assoziat erhalten bleiben.

Tabelle 3.5. :

Substanz	Lage der δ_{OH}-Schwingung des Tyrosin-Restes (cm^{-1})		Art der Brücke bei Hydratation
	trocken	hydratisiert	
$(L\text{-Tyr})_n$	1220	1232-35	O-H...O$^{H}_{H}$
copoly(L-Lys·HBr, L-Tyr)$_n$	1222	1236	O-H...O$^{H}_{H}$
copoly(L-Lys, L-Tyr)$_n$	1248	1248	O-H...N
$(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Tyr})_n$	1245-48	1245-48	O-H...N

- Einfluß auf das Protontransfergleichgewicht :

Wie beim Copolymeren konnte auch hier keine hydratationsabhängige Veränderung des Protontransfergleichgewichtes festgestellt werden, denn die für den Protontransfer charakteristischen Banden ändern sich nicht, wie das gestrichelte Teilspektrum in Abbildung 3.16. b) zeigt.
Hinsichtlich der veränderlichen Schulter bei 1540 cm^{-1} gilt das bereits in Abschnitt 3.1.2.3. gesagte.
Die Verhältnisse hinsichtlich des Protontransfers sind nochmals in Tabelle 3.6. zusammengefaßt.

Tabelle 3.6. :

System	Protontransfer (%) trocken	hydratisiert
copoly(L-Lys,L-Tyr)$_n$	10-20	10-20
(L-Lys)$_n$+(L-Tyr)$_n$	10	10

3.1.3.4. Konformation des Rückgrates :

In Abbildung 3.18. ist in durchgezogener Linie das Muster der Amid-I-und der Amid-II-Bande in Abszissendehnung an einem (L-Lys)$_n$+(L-Tyr)$_n$-Film relativ geringer Schichtdicke gezeigt. Deutlich ist die aufgespaltene Amid-I-Bande mit Maxima bei 1650 cm^{-1} und 1630 cm^{-1} und einer Schulter bei 1690 cm^{-1} zu erkennen. Weiterhin zeigt Abbildung 3.18. die entsprechenden Amid-Banden von (L-Tyr)$_n$, welches in antiparalleler β-Struktur vorliegt (Lit.4) und von (L-Lys)$_n$ der Kettenlänge n = 2286 (punktiert bzw. gestrichelt), welches, wie bereits gezeigt, die α-Helix bevorzugt.

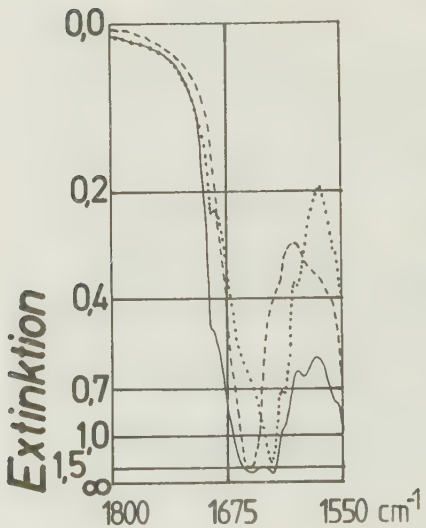


Abbildung 3.18. : Bereich der Amid-I-Bande von
(———) : (L-Lys)$_n$+(L-Tyr)$_n$
(- - -): (L-Lys)$_n$
(. . .): (L-Tyr)$_n$

Der Vergleich der Banden in Abbildung 3.18. zeigt, daß im 1:1-Gemisch von $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Tyr})_n$ offensichtlich die Konformationen der isolierten Partner unverändert vorliegen, nämlich α-Helix bei $(L\text{-Lys})_n$ und antiparallele β-Konformation bei $(L\text{-Tyr})_n$.
Dennoch ist, wie in Abschnitt 3.1.3.1. gezeigt wurde, eine vollständige Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen möglich.
In Tabelle 3.7. findet sich eine Zusammenstellung der Amid-Banden der besprochenen Systeme mit den zugehörigen Konformationen.

Tabelle 3.7. :

Substanz	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})	Konformation
$(L\text{-Lys})_{2286}$	3292	1650	1544	α-Helix
$(L\text{-Tyr})_{25}$	3289	1629,1690	1535-40	antiparal.β
$(L\text{-Lys})_{2286}$+$(L\text{-Tyr})_{25}$	3288	1650, 1630, 1690	1540	α-Helix + antiparal. β
copoly$(L\text{-Lys},L\text{-Tyr})_n$	3279	1625 1652 sh	1530-35	antiparal.β + wenig Knäuel

3.1.4. Poly-L-Lysin + Poly-L-Glutaminsäure 1:1

Die Kettenlängen betrugen n = 2286 für $(L\text{-Lys})_n$ und n = 301 für $(L\text{-Glu})_n$.
In dieser Kombination sollten die Wasserstoffbrücken zwischen den γ-Carboxylgruppen von $(L\text{-Glu})_n$ und den ε-Aminogruppen von $(L\text{-Lys})_n$ gemäß $-C(=O)-O-H\ldots NH_2-R \rightleftharpoons -C(=O)-O^-\ldots HNH_2^+-R$ untersucht werden.

3.1.4.1. Lage des Protontransfergleichgewichtes :

Wie Lindemann (Lit.5) an Polyglutaminsäure/N-Base-Systemen zeigen konnte, ist die Abnahme der Intensität der C=O-Valenzschwingung der γ-Carboxylgruppen von $(L\text{-Glu})_n$ bei 1715 cm^{-1} ein gutes Maß zur Ermittlung von Protontransfergleichgewichten.
Die erwähnte Bande ist punktiert im Spektrum des 1:1-Gemisches von $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Glu})_n$ in Abbildung 3.19. zu sehen.
Wie aus dem durchgezogen gezeichneten Spektrum des Assoziates in Abbildung 3.19. ersichtlich ist, fehlt hier diese Bande vollständig. Stattdessen erscheint die symmetrische Schwingung der Carboxylatgruppe $-CO_2^-$ bei 1395 cm^{-1}, während sich die antisymmetrische Schwingung der $-CO_2^-$ - Gruppe, die bei 1560-65 cm^{-1} auftaucht (Lit.5),mit der Amid-II-Bande des Rückgrates überlagert und somit nicht identifiziert werden konnte.

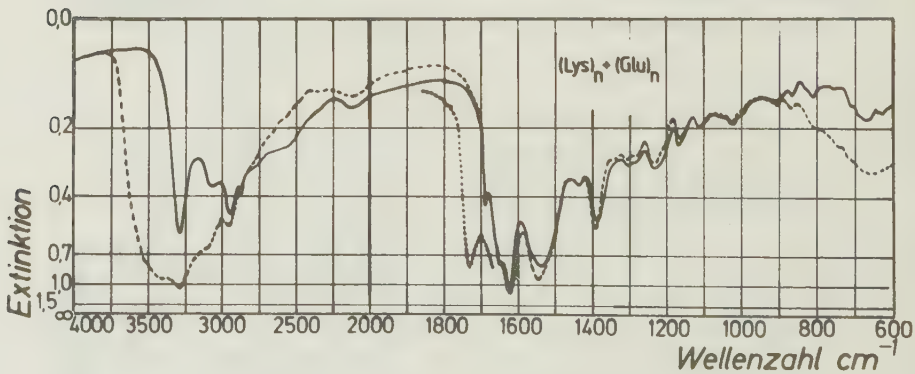


Abbildung 3.19. (——) : $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Glu})_n$ wasserfrei
(- - -): dto. hydratisiert
(. . .): $\nu_{C=O}$-Schwingung von $(L\text{-Glu})_n$

Hieraus ist zu folgern, daß das Gleichgewicht weitgehend auf der Seite der polaren Grenzstruktur liegt, was bei der pk_a-Differenz von $\Delta pk_a \approx 6$ auch nicht verwundert.
Im wasserfreien System sollten die geladenen Seitengruppen assoziiert sein, d.h. es sollte keine Dissoziation des Protontransferkomplexes in isolierte Ionen eintreten.
Dies bestätigt die Anwesenheit einer breiten Bande zwischen etwa 2700 cm^{-1} und 2200 cm^{-1}, da Absorption in diesem Bereich charakteristisch für über Wasserstoffbrücken gebundene protonierte Amine ist.(Lit.3)

3.1.4.2. Einfluß der Hydratation :

Das gestrichelte Spektrum in Abbildung 3.19. zeigt ein $(L\text{-}Lys)_n$+$(L\text{-}Glu)_n$-Assoziat bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit, entsprechend einer Beladung von 3-4 Molekülen Wasser pro Säure-Base-Paar, was aus der Intensität der OH-Valenzschwingung des angelagerten Wassers folgt.
Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zum Spektrum des getrockneten Filmes ist zu erkennen: Die Absorption zwischen 2700 und 2300 cm^{-1} ist weitgehend verschwunden.
Dies deutet auf eine nahezu vollständige Dissoziation der Brücken in einzelne solvatisierte Ionen hin.

3.1.4.3. Konformation des Rückgrates :

Die Lage der Amid-Banden, die in Tabelle 3.8. zusammengestellt sind, läßt im vorliegenden System auf die überwiegende Anwesenheit von antiparalleler β-Struktur zusammen mit geringen Anteilen an Knäuel oder α-Helix schließen.

Die β-Struktur wird durch die relativ tiefe Lage der Amid-A-Bande bei 3271 cm^{-1} und die Absorption der Amid-I-Bande bei 1627 cm^{-1} mit einer schwachen Schulter bei 1692 cm^{-1} angezeigt, während die Schulter bei 1651 cm^{-1} entweder auf einen geringfügigen α-helikalen oder Knäuel-Anteil schließen läßt.
Die Amid-II-Bande ließ sich hier nicht zur Auswertung heranziehen, da sie teilweise von der antisymmetrischen Carboxylatschwingung bei 1560 cm^{-1}(Lit.5) überlagert wird.

Tabelle 3.8. :

Substanz	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Konformation
$(L\text{-Glu})_n + (L\text{-Lys})_n$ getrocknet	3271	1627, 1692, 1651sh	antiparallele β + wenig Helix oder Knäuel
hydratisiert bei 90 % rel. LF.	3271	1625, 1692, 1650sh	" "
$(L\text{-Lys}\cdot HBr)_n$ bei Luftfeuchtigkeit kleiner als 85 % (Lit.9,10)	3265	1625, 1693	antiparallele β
$(L\text{-Lys}\cdot HClO_4)_n$ bei Luftfeuchtigkeit zwischen 0 und 90 % (eigene Messung)	3271	1626, 1697	" " β
$(L\text{-Glu}^-Na^+)_n$ bei Luftfeuchtigkeit kleiner als 30 % (Lit.8)	3260	1626, 1690	antiparallele β

Die gefundenen Ergebnisse hinsichtlich der Konformation sind in guter Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten Befunden an ähnlichen Systemen, wie aus folgendem hervorgeht:

Tabelle 3.8. zeigt, daß Filme von $(L\text{-Lys}\cdot HBr)_n$ bei Luftfeuchtigkeiten unterhalb 85 % die antiparallele β-Struktur bevorzugen, ebenso wie Filme des Natriumsalzes von $(L\text{-Glu})_n$ bei niedrigen Luftfeuchtigkeiten. Ebenfalls β-Konformation fand Lindemann (Lit.5) für das Assoziat von $(L\text{-Glu})_n$ mit Propylamin bei geringer Hydratation.
Hiernach bevorzugen die geladenen Spezies von $(L\text{-Glu})_n$, bzw $(L\text{-Lys})_n$ bei geringer Luftfeuchtigkeit jeweils die β-Konformation.
Dies ist in guter Übereinstimmung mit der beobachteten β-Struktur des Protontransfer-Adduktes von $(L\text{-Lys})_n$ mit $(L\text{-Glu})_n$.
Eine Bevorzugung der α-helikalen Konformation bei hoher Luftfeuchtigkeit, wie sie bei den erwähnten Referenzsystemen $(L\text{-Lys}\cdot HBr)_n$

und $(L\text{-}Glu^{-}Na^{+})_n$ auftritt, konnte im Gegensatz zu diesen Systemen hier jedoch nicht beobachtet werden, wie des Spektrum eines bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit hydratisierten $(L\text{-}Glu)_n$+$(L\text{-}Lys)_n$-Gemisches in Abbildung 3.19. (- - -) zeigt.
Vielmehr liegt auch im hydratisierten Zustand antiparallele β-Sruktur vor. (Vergleiche Tabelle 3.8.)

3.1.5. Poly-L-Glutaminsäure + Poly-L-Histidin :

Bei dieser Kombination sollte die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der γ-Carboxylgruppe von $(L\text{-}Glu)_n$ und der Imidazolgruppe von $(L\text{-}His)_n$ vom Typ

$-\overset{O}{\underset{O}{C}}-H\ldots N\text{-}His. \rightleftharpoons -\overset{O}{\underset{O^{-}}{C}}\ldots HN^{+}\text{-}His.$ untersucht werden.

Entsprechend den pk_a-Werten von 4,45 (Lit.17) für $(L\text{-}Glu)_n$ und 6,15 (Lit.18) für $(L\text{-}His)_n$ waren weitgehend symmetrische Wasserstoffbrücken zu erwarten. Dies insbesondere auch im Hinblick auf die Ergebnisse an den analogen Polymer-Monomer-Kombinationen. (Lit.5, 11)

Die Kettenlänge der untersuchten Proben betrug n = 301 für $(L\text{-}Glu)_n$ und lag je nach Versuch zwischen n = 36 und n = 110 für $(L\text{-}His)_n$. Die unterschiedlichen Kettenlängen hatten jedoch keinen Einfluß auf die IR-Spektren.

3.1.5.1. Indizien für die Brückenbildung :

Auf die erfolgte Assoziatbildung deutete erstens die Bildung eines feinen Niederschlages bei der Herstellung des Komplexes hin.(siehe Abschnitt 2.3.2.12.)
Weiterhin sind im Spektrum des 1:1-Gemisches in Abbildung 3.20. deutlich breite Banden bei etwa 2550 cm^{-1} und bei 1950 cm^{-1} zu erkennen.
Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß diese Banden durch Carbonsäure - N-Base-Wasserstoffbrücken verursacht werden. (Lit. 12-15 u.19)
In analogen Systemen wird bisweilen auch noch eine dritte Bande

bei etwas höheren Wellenzahlen gefunden.(Lit.13)
Hadži (Lit.15) nennt diese drei Banden ABC-Banden und ordnet sie der OH-Valenz-, dem ersten Oberton der OH-in plane-Deformation- und dem ersten Oberton der OH-out of plane-Deformationsschwingung zu, wobei die beiden letzteren ihre Intensität durch Fermi-Resonanz mit der Valenzschwingung beziehen. Auch Claydon und Sheppard (Lit.16) diskutieren Fermi-Resonanz zwischen diesen Schwingungen.

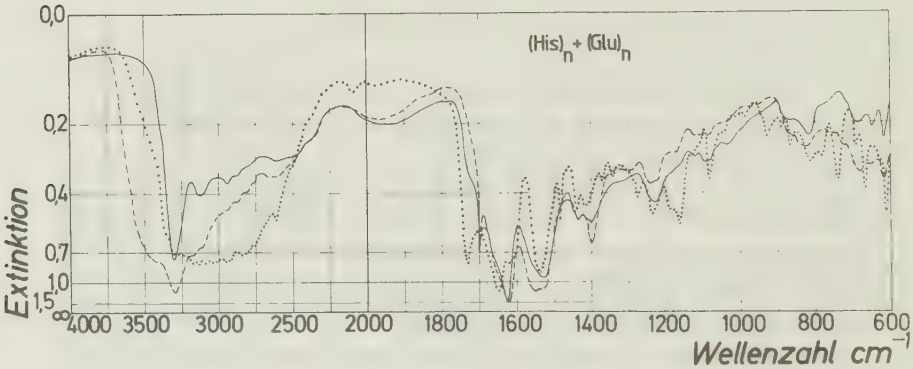


Abbildung 3.20. (———) : Wasserfreies 1:1-Assoziat von $(L\text{-His})_n$ und $(L\text{-Glu})_n$

(- - -): dto. nach Hydratation bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit

(. . .): $(L\text{-His})_n + (L\text{-Glu})_n$ mit HCl protoniert

Ein Maß für die Symmetrie der vorliegenden Brücken lieferte die Bestimmung des Protontransfers.

3.1.5.2. Lage des Protontransfer-Gleichgewichtes :

Ebenso wie beim 1:1-Gemisch von $(L\text{-Lys})_n$ mit $(L\text{-Glu})_n$ wurde auch hier die Intensität der C=O - Valenzschwingung der Carbonsäuregruppe als Maß für den Protontransfer herangezogen.
Diese Schwingung ist im Spektrum des mit HCl bedampften Filmes

(Abbildung 3.20.punktiert) bei 1720 cm^{-1} zu sehen.
Dagegen ist im Spektrum des wasserfreien 1:1-Gemisches (Abbildung 3.20. durchgezogenes Spektrum) bei dieser Wellenzahl lediglich eine Schulter zu erkennen.
Stattdessen ist sowohl die antisymmetrische Carboxylatschwingung von $(L\text{-Glu})_n$ bei etwa 1560 cm^{-1} als Schulter an der Amid-II-Bande, als auch die symmetrische Carboxylatschwingung bei 1395 cm^{-1} zu beobachten.
Der im getrockneten Zustand durch Auswertung der integralen Extinktion ermittelte Wert für den Protontransfer ergab sich als Mittel aus mehreren Messungen zu PT = 75 %.
Es liegt also eine leicht polarisierbare Wasserstoffbrücke mit geringfügig überwiegendem Anteil an polarer Grenzstruktur vor.

Die bereits unter 3.1.5.1. erwähnte Bandenstruktur kommt primär durch die in den Strichspektren aufgeführten Protonenübergänge(Abbildung 3.6.)zustande, wie sie in den Kombinationen von $(L\text{-Lys})_n$ mit Chlorphenolen diskutiert wurden.(Vergleiche Abschnitt 3.1.1.)
Diese Übergänge würden jedoch nur eine breite, kontinuierliche Struktur verursachen (Vergleiche Abbildung 3.7.), wenn diese nicht- wie bereits erwähnt - mit den Oberschwingungen der Deformationsschwingungen koppeln würden.
Das üblicherweise bei derartigen polarisierbaren Brücken beobachtete Kontinuum, das sich nach kleineren Wellenzahlen fortsetzt, (Lit.12)ist hier nicht zu beobachten, da diese Filme aufgrund des erwähnten Herstellungsverfahrens aus einer Suspension stark streuten und zudem nur geringe Schichtdicke besaßen.
Zur Aufnahme der gezeigten Spektren wurde die Streuung durch eine Vergleichsküvette mit entsprechend aufgerauhten Fenstern kompensiert.

3.1.5.3. Einfluß der Hydratation :

- Adsorbierte Wassermenge :

Aus der Intensität der OH-Valenzschwingung im Spektrum eines bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit hydratisierten $(L\text{-His})_n$+$(L\text{-Glu})_n$-Filmes (Abbildung 3.20. - - -) ist ersichtlich, daß sich das Assoziat relativ hydrophob verhält. So liegt der Hydratationsgrad zwischen

1 und 2 Moleküle Wasser pro Säure-Base-Paar.

- Einfluß auf die Dissoziation der Brücken :

Aus Untersuchungen des Assoziationsverhaltens monomerer Carbonsäure/N-Base-Systeme ist bekannt, daß die Zugabe von 2 Molekülen Wasser pro Säure-Base-Paar noch keine Dissoziation der Brücken verursacht.(Lit.12)
Hierauf deutet auch hin, daß im Spektrum der hydratisierten Spezies (Abbildung 3.20. gestrichelt) keine wesentliche Änderung des - wie oben bereits diskutiert - für Brückenbildung charakteristischen Bandenverlaufes bei 1950 cm^{-1} beobachtet wird im Vergleich zum Spektrum der wasserfreien Substanz.(Abbildung 3.20. durchgezogen) Die Bande bei 2550 cm^{-1} wird im hydratisierten Fall ebenfalls beobachtet.
Hieraus ist auf Erhaltung der Wasserstoffbrücken bei Anlagerung von 1-2 Molekülen Wasser zu schließen.

- Einfluß auf das Protontransfergleichgewicht :

Wie bei den Kombinationen von $(L\text{-}Glu)_n$ mit monomeren N-Basen (Lit.5) erwies sich auch hier das Ausmaß des Protontransfers als sehr stark vom Hydratationsgrad abhängig, wie aus der Abnahme der Intensität der C=O - Valenzschwingung im Spektrum der hydratisierten Probe (Abbildung 3.20. gestrichelt) ersichtlich ist.
Die ermittelten Werte für den Protontransfer in Abhängigkeit von der Hydratation sind in Tabelle 3.9. aufgeführt.

Tabelle 3.9. :

rel. Luftfeuchtigkeit (%)	Protontransfer (%)
0	75
33	82
56	86
90	90

In Abbildung 3.21. ist der Zusammenhang graphisch aufgetragen.

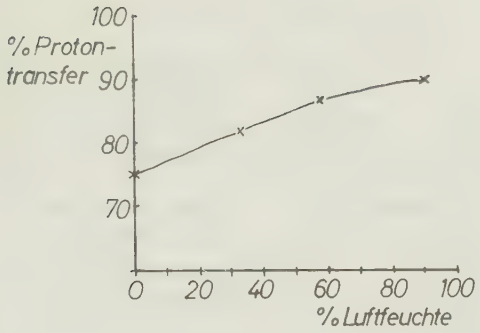


Abbildung 3.21. Abhängigkeit des Protontransfers im System $(L\text{-His})_n+(L\text{-Glu})_n$ vom Hydratationsgrad

Die erhaltenen Ergebnisse korellieren gut mit den von Lindemann (Lit.5) am System $(L\text{-Glu})_n$/Imidazol erhaltenen Werten von 56 % Protontransfer im wasserfreien Assoziat bzw. 86 % im hydratisierten Zustand.
In ähnlicher Weise wurde ebenfalls von Lindemann (Lit.11) eine extrem starke Hydratationsabhängigkeit des Protontransfers in der Kombination von $(L\text{-His})_n$ mit Essigsäure beobachtet.

Die in Abbildung 3.20. ersichtliche relativ geringfügige Veränderung der Bandenstruktur im Bereich zwischen 3000 und 1800 cm^{-1} mit zunehmendem Protontransfer entspricht den Beobachtungen bei den analogen Monomer-Systemen, wo die Bande mit Maximum bei 1950 cm^{-1} abnimmt und dafür bei 2700 cm^{-1} eine breite Bande auftaucht (Lit.12), die charakteristisch für protonierte, wasserstoffbrücken-gebundene Amine ist.(Lit.3)

3.1.5.4. Konformation des Rückgrates :

Die in Tabelle 3.10. gezeigte Lage der Amid-Banden der Assoziatspektren läßt auf einen weit überwiegenden Anteil an antiparalleler β-Struktur zusammen mit geringem Anteil an Knäuel schliessen.
Konformative Änderungen in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad wurden nicht beobachtet.

Tabelle 3.10. :

Substanz	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})	Konformation
$(L\text{-Glu})_n$ + $(L\text{-His})_n$	3272	1624, 1696, 1655sh	1529	antiparallele β + wenig Knäuel
$(L\text{-Glu}^-Na^+)_n^x$ bei Luftfeuchtigkeit kleiner 30 %	3260	1626, 1690	1530	antiparallele β
$(L\text{-His}\cdot HCl)_n^{xx}$	3128	1659	-	keine antiparallele β

x : (Lit.8)

xx : (Lit.11)

Interessant ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich dieses Ergebnisses mit den bevorzugten Konformationen der jeweils isolierten, salzartigen Polymeren $(L\text{-Glu}^-Na^+)_n$ und $(L\text{-His}\cdot HCl)_n$. (Vergleiche hierzu Tabelle 3.10.)
Während - wie bereits beim System $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Glu})_n$ erwähnt - Filme von wasserfreier $(L\text{-Glu}^-Na^+)_n$ die antiparallele β-Struktur bevorzugen, liegt $(L\text{-His}\cdot HCl)_n$ nicht in β-Konformation vor.(Lit.8, 11)
Das vorliegende Experiment zeigt somit, daß offensichtlich bei der Kombination der beiden Polymeren die Poly-L-Glutaminsäure beim Poly-L-Histidin die Ausbildung der β -Konformation induziert.

3.2. Messungen an S-H...N $\rightleftharpoons$ S^-...HN^+ - Brückensystemen :

3.2.1. Poly-L-cystein + N-Basen :

3.2.1.1. Übersicht über die Systeme :

In den folgend beschriebenen $(L\text{-Cys})_n$+ N-Base-Kombinationen sollte die Lage des Protontransfergleichgewichtes gemäß S-H...N $\overset{k_t}{\rightleftharpoons}$ S^-...HN^+ innerhalb der Wasserstoffbrücke zwischen der Sulfhydryl-Seitengruppe von $(L\text{-Cys})_n$ und der jeweiligen N-Base in Abhängigkeit vom Δpk_a untersucht werden.
Die herangezogenen Kombinationen sind in Tabelle 3.11. zusammen mit dem zugehörigen pk_a-Wert der protonierten N-Base, bzw. dem Δpk_a zwischen $(L\text{-Cys})_n$ und protonierter N-Base aufgeführt. Weiterhin finden sich dort die Ergebnisse für K_t bzw. den Protontransfer PT.

Tabelle 3.11. :

System	pk_a(prot. N-Base)	$\Delta pk_a^{(x)}$	K_t	PT (%)
$(L\text{-Cys})_n$+N-Methyl-imidazol	$7,2$(Lit.21)	-1,8	0,0	0
$(L\text{-Cys})_n$+ Propyl-amin	$10,5$(Lit.24)	1,5	0,20	17
$(L\text{-Cys})_n$+ Dipro-pylamin	$11,0$(Lit.23)	2,0	0,79	44
$(L\text{-Cys})_n$+ Pyrro-lidin	$11,2$(Lit.24)	2,2	4,0	80
$(L\text{-Cys})_n$+ Lysidin	$11,3$(Lit.24)	2,3	3,0	75
$(L\text{-Cys})_n$+ N-α-Ben-zoyl-argininamid	$12,5$(xx)	3,5	∞	100
$(L\text{-Cys})_n$+ Methyl-guanidin	$13,4$(Lit.24)	4,4	∞	100

(xx) : Es wurde der pk_a - Wert von Arginin angenommen.(Lit.23)
(x) : Aufgrund der ungünstigen Löslichkeitseigenschaften von $(L\text{-Cys})_n$ finden sich in der Literatur keine verlässlichen Angaben über den zugehörigen pk_a-Wert.
Deshalb wurde ein von Hayd (Lit.25) mit einer SCF-Rechnung ermittelter

pk_a-Wert von 9,0 benutzt. Dieser Wert erscheint plausibel hinsichtlich des bekannten pk_a-Wertes der SH-Gruppe von monomerem Cystein, der bei 8,4 liegt.(Lit.26)
Abgesehen davon ist für die hier angestellten Betrachtungen die Kenntnis des Absolutwertes unnötig, da bei den Δpk_a-Angaben der pk_a-Wert von $(L\text{-Cys})_n$ als konstante Größe eingeht.

In Abbildung 3.22. a)-g) sind die zugehörigen Spektren gezeigt und als Vergleich dazu in Abbildung 3.22. h)-i) die Spektren von $(L\text{-Cys})_n$ und dem entsprechenden Natriumsalz $(L\text{-Cys}^-Na^+)_n$.

Die Kettenlänge des verwendeten $(L\text{-Cys})_n$ war einheitlich n = 44 bei allen Untersuchungen.
Die Herstellung der verschiedenen $(L\text{-Cys})_n$+ N-Base-Filme ist im Abschnitt 2.3.2.5. beschrieben.

3.2.1.2. Indizien für Brückenbildung :

Verschiebung der SH-Valenzschwingung :

Als guter Indikator für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den SH-Gruppen von $(L\text{-Cys})_n$ und den Aminogruppen der jeweiligen Base diente die Verschiebung der SH-Valenzschwingung nach kleineren Wellenzahlen.
Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß infolge der geringen Bindungsstärke von S-H...X - Wasserstoffbrücken derartige Verschiebungen im Vergleich zu den analogen O-H...X - Brücken klein sind. (Lit.27)
So erfolgt z.B. bei Zugabe von Dibenzylamin zu Thiophenol eine Verschiebung der ν_{SH} um 102 cm^{-1} von 2577 cm^{-1} nach 2475 cm^{-1}.(Lit.28)
Eine ähnliche Verschiebung läßt sich bei Zugabe von N-Methyl-imidazol zu Thiophenol beobachten, wie das gestrichelte Spektrum in Abbildung 3.23. zeigt.
Das durchgezogen gezeichnete Teilspektrum in Abbildung 3.23. zeigt anhand der starken Verbreiterung der ν_{SH}, daß sich auch bei Verwendung von Propylmercaptan anstelle von Thiophenol trotz der wesentlich geringeren Acidität noch Wasserstoffbrücken ausbilden.
In Abbildung 3.24. ist die Verschiebung der ν_{SH} des $(L\text{-Cys})_n$ von

2552 cm^{-1} nach 2524 cm^{-1} nach Bedampfung mit Propylamin zu sehen.

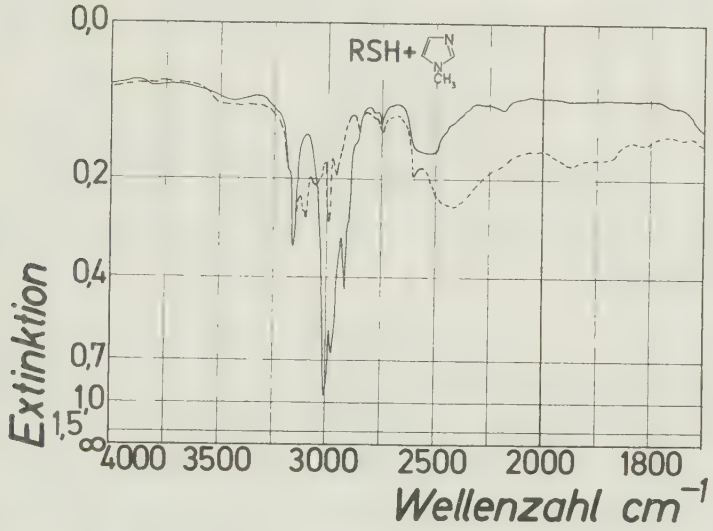


Abbildung 3.23. : Verschiebung der ν_{SH}-Schwingung bei Brückenbildung

(- - -): N-Methyl-imidazol + Thiophenol
(——) : " " + Propylmercaptan

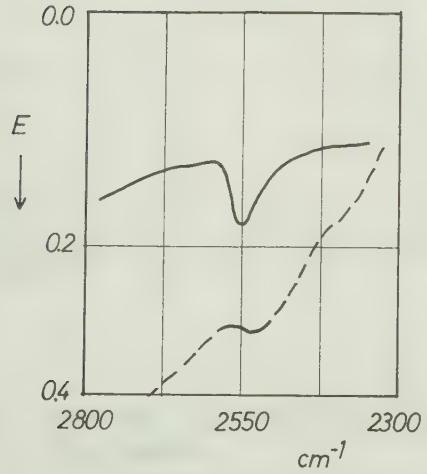


Abbildung 3.24.: Verschiebung der ν_{SH}-Schwingung von $(L\text{-Cys})_n$ nach Bedampfung mit Propylamin

(——): $(L\text{-Cys})_n$

(- - -):$(L\text{-Cys})_n$+Propylamin

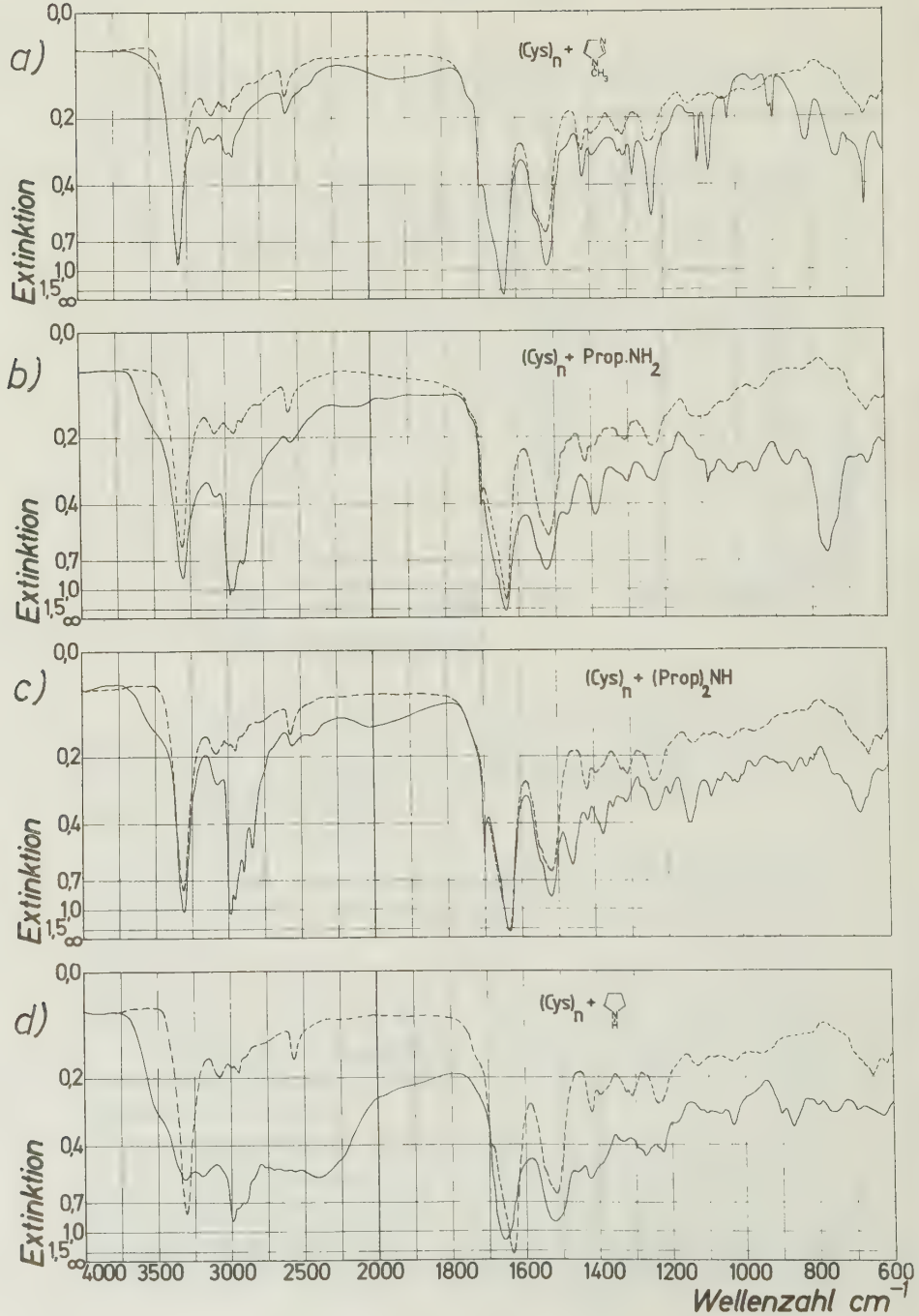


Abbildung 3.22. a)-d) Erläuterungen siehe Seite 77!

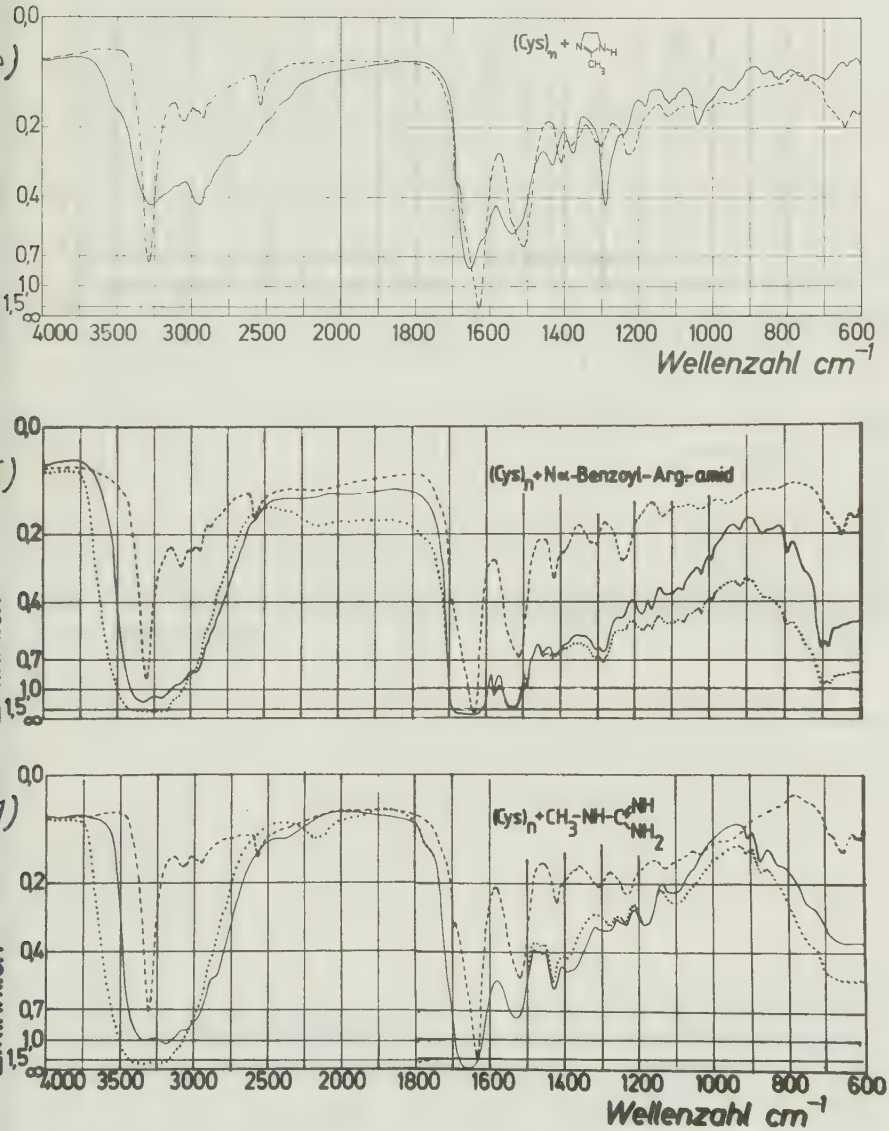


Abbildung 3.22. e)-g)

Erläuterungen zu Abbildung 3.22. a)-g) :

(——) : $(L\text{-Cys})_n$ + jeweilige N-Base

(- - -): $(L\text{-Cys})_n$-Film entsprechender Schichtdicke ohne Base

(....) : Hydratisierter Film von $(L\text{-Cys})_n$ + jeweilige N-Base

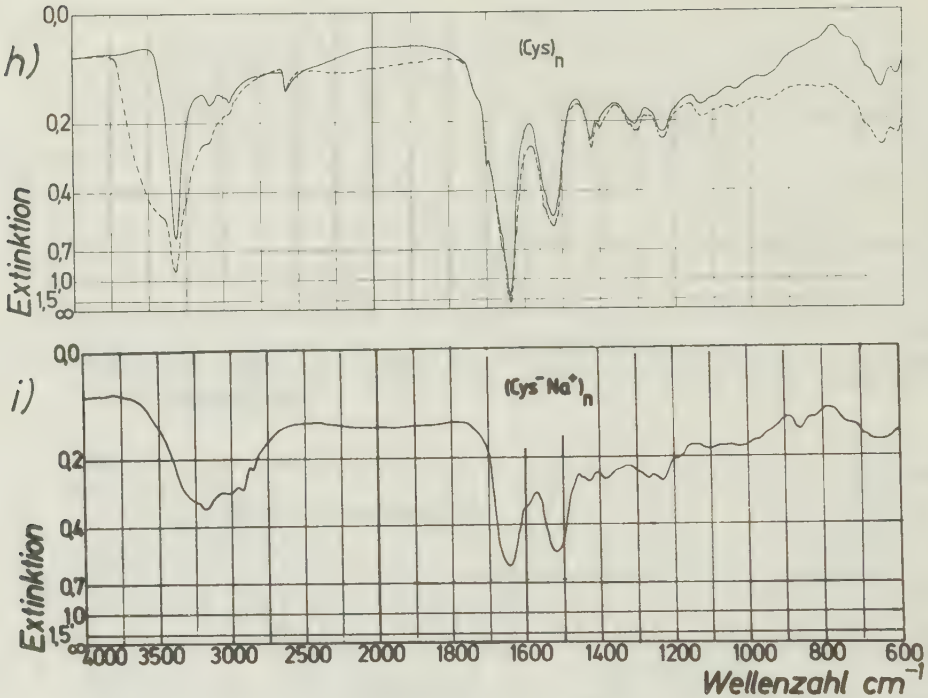


Abbildung 3.22. h)-i)

(——) : Wasserfreier Film

(- - -): Hydratisierter Film (90 % rel. Luftfeuchtigkeit)

(Fortsetzung von Seite 75)

Auffallend ist das im Vergleich zum obig aufgeführten Beispiel Thiophenol + Dibenzylamin vergleichsweise geringe Ausmaß der Verschiebung.

Dies wird besonders deutlich beim Vergleich des in Abbildung 3.22.a) gezeigten Spektrums der Kombination $(L\text{-Cys})_n$ + N-Methyl-imidazol mit einem analogen System in flüssiger Phase, nämlich Propylmercaptan + N-Methyl-imidazol, dessen Teilspektrum in Abbildung 3.23. in durch-

gezogener Linie zu sehen ist.
Im letzteren Fall deutet eine breite, intensive, gegenüber freiem Propylmercaptan nach kleinen Wellenzahlen verschobene Valenzschwingung auf die Ausbildung von Wasserstoffbrücken hin, während das $(L\text{-}Cys)_n$+N-Methyl-imidazol-Spektrum in Abbildung 3.22.a) die gegenüber unbedampften $(L\text{-}Cys)_n$ in Intensität und Lage unveränderte Valenzschwingung bei 2552 cm^{-1} zeigt,und somit auf die Nichtexistenz von Wasserstoffbrücken schließen läßt.
Hieraus ist zu folgern, daß in den Filmen die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Seitengruppen vermutlich infolge sterischer Restriktionen, die durch die Starrheit des Peptid-Rückgrates bedingt sind, erschwert ist.
Naturgemäß kommt dieser Effekt bei den sehr langen und schwachen Brücken vom Typ S-H...X eher zum Ausdruck als z.B. bei kräftigeren N-H...O - Brücken.
So liegen die mittels Röntgenbeugung ermittelten Bindungslängen von S-H...N - Brücken im Bereich zwischen 3,25 und 3,55 A.(Lit.30)

Bei der Kombination von Dipropylamin mit $(L\text{-}Cys)_n$ (Abbildung 3.22.c) ist sowohl die unveränderte ν_{SH}-Schwingung bei 2552 cm^{-1} als auch eine Bande bei 2405 cm^{-1} zu sehen.
Die Erklärung hierfür ist, daß sich in diesem Fall die $(L\text{-}Cys)_n$-Filme lediglich bis zu maximal 65 Mol% mit Dipropylamin bedampfen ließen,und somit rund 35 % unassoziierte SH-Gruppen vorlagen.

Bei der Kombination von $(L\text{-}Cys)_n$ mit Pyrrolidin (Abbildung 3.22.d) schließlich findet sich eine breite Bande bei etwa 2400 cm^{-1}, welche brückengebundenen SH-Gruppen zugeordnet werden kann.
Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 3.12.

Tabelle 3.12. :

Substanz	ν_{SH} (cm^{-1})	$\Delta\nu = \nu_{(Cys)_n} - \nu_{SH_{Komplex}}$	Brückenbildung
$(L\text{-}Cys)_n$	2552	-	-
$(L\text{-}Cys)_n$+N-Meth.-imidazol	2552	0	keine Ausbildung
$(L\text{-}Cys)_n$+Prop.amin	2524	28	Ausbildung
$(L\text{-}Cys)_n$+Diprop.amin	2405	147	"
$(L\text{-}Cys)_n$+Pyrrolidin	2400	152	"

Bei den weiterhin untersuchten Systemen handelt es sich um eine andere Familie von N-Basen, nämlich um Lysidin und zwei substituierte Guanidine.
Aus Untersuchungen von N-Basen mit O-H - Donoren ist bekannt, daß diese Gruppe von Verbindungen längere Wasserstoffbrücken ausbildet als primäre oder sekundäre Amine.(Lit.74)
Im System $(L\text{-Cys})_n$+Lysidin (Abbildung3.22.e) findet man anstelle der ν_{SH}-Schwingung eine sehr breite Bande mit Maximum bei etwa 2700 cm^{-1}, während in den Kombinationen von $(L\text{-Cys})_n$ mit N-α-Benzoyl-arginin-amid und Methylguanidin, bei denen, wie im folgenden gezeigt wird,vollständiger Protontransfer vorliegt, die erwähnte Bande nach noch höheren Wellenzahlen verschoben ist.(Abbildung 3.22.f,g)

Daß auch in den letzteren Fällen bei Abwesenheit von Wasser Wasserstoffbrücken zwischen $(L\text{-Cys})_n$ und N-Base ausgebildet sind, wird durch Vergleich mit den Veränderungen bei Hydratation deutlich. (punktierte Spektren in Abbildung 3.22.f,g)
Bei Hydratation verschiebt sich nämlich die Flanke der breiten Bande nach noch höheren Wellenzahlen, was das Aufbrechen der $S^-...HN^+$ - Brücken und damit deren Existenz in den wasserfreien Systemen anzeigt.

3.2.1.3. Lage des Protontransfergleichgewichtes in den $(L\text{-Cys})_n$+ + N-Base - Assoziaten :

Die Auswertung des Protontransfers erfolgte - wie bereits in Abschnitt2.6.4.2. beschrieben - mit Hilfe jeweils spezifischer Banden des Amins bzw. dessen Hydrochlorids.
Die auf diese Weise erhaltenen Werte für K_t bzw. den Protontransfer PT sind in Tabelle 3.11. aufgeführt.
In den Abbildungen 3.25. und 3.26. sind die Ergebnisse graphisch aufgetragen.
Der Symmetriepunkt der in Abbildung 3.25. gezeigten Protontransferkurve bzw. der Achsenabschnitt des in Abbildung 3.26. gezeigten Huysken-Plots liegt bei $\Delta pk_a = 2,0$.

Interessant ist der bei der Kombination von $(L\text{-Cys})_n$ mit Lysidin mit $K_t = 3,0$ geringere Protontransfer als im $(L\text{-Cys})_n$+Pyrrolidin-Gemisch, wo für K_t ein Wert von 4,0 ermittelt wurde, obwohl beide

Basen annähernd gleiche pK_a-Werte besitzen.(11.2 bzw 11,3 in Lit.24) Der Grund hierfür mag in der Tendenz der Amidin-artigen Gruppierung von Lysidin zur Ausbildung von - im Vergleich zu primären und sekundären Aminen - relativ langen und damit schwachen Wasserstoffbrücken liegen.

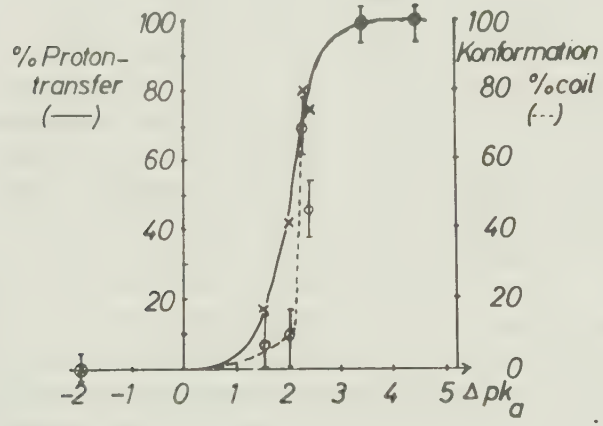


Abbildung 3.25. : (——) : Protontransferkurve des Systems $(L\text{-Cys})_n$ mit verschiedenen N-Basen

(- - -): Mit dem Protontransfer korellierte Konformationsänderung des Rückgrates von antiparalleler β-Struktur zum Knäuel

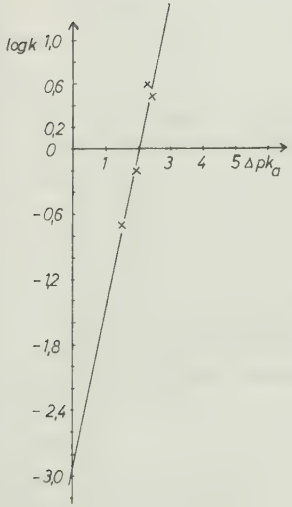


Abbildung 3.26. :

Huyskens-Plot des Systems $(L\text{-Cys})_n$ mit verschiedenen N-Basen

So zeigt eine Übersicht, daß für O-H...N - Brücken eines O-H - Protondonors mit Guanidin-bzw. Amidin-artigen N-Basen die N-O - Bindungslängen zwischen 2,8 und 3,1 A liegen, während der entsprechende Abstand bei Verwendung primärer und sekundärer Amine zwischen 2,7 und 2,9 A liegt.(Lit.74)

Auffallend ist in Abbildung 3.25. die starke Aufsteilung der Protontransfer-Kurve im Vergleich zum Verlauf bei der Kombination von $(L\text{-Lys})_n$ mit Chlorphenolen.(vergleiche Abbildung 3.4.)
Einen ähnlichen Effekt beobachtete bereits Lindemann (Lit.11) bei Assoziaten von Carbonsäuren mit $(L\text{-His})_n$.
Wie dort findet auch hier die starke Aufsteilung der Protontransfer-Kurve eine Erklärung darin, daß - wie im folgenden gezeigt werden wird - der Protontransfer und eine kooperative Konformationsänderung des $(L\text{-Cys})_n$-Rückgrates miteinander gekoppelt ablaufen.

3.2.1.4. Polarisierbarkeit und kontinuierliche Absorption :

Die Ergebnisse im vorigen Abschnitt haben gezeigt, daß auch die $S\text{-H}...N \rightleftharpoons S^-...HN^+$ - Brücken weitgehend symmetrisch sein können. Aufgrund der Theorie sollten diese damit auch leicht polarisierbar sein.(Lit.50)
Da bei diesen langen Wasserstoffbrücken der Wall des Doppelminimums besonders hoch ist, sollten die Polarisierbarkeiten besonders groß sein.
Allerdings ist zu bedenken, daß unter diesen Bedingungen auch die Protonenfluktuationsfrequenz relativ klein ist,und im Hinblick auf die Länge und Schwäche der Brücken auch die Lebensdauer relativ kurz ist.
Üblicherweise verursachen leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken Kontinua in den IR-Spektren, wie bereits in Abschnitt 1.2. näher diskutiert wurde.
Im folgenden sollen die $(L\text{-Cys})_n$+ N-Base-Spektren unter diesen Gesichtspunkten betrachtet werden:

- Im Spektrum von $(L\text{-Cys})_n$ mit N-Methyl-imidazol (Abbildung 3.22.a) sind die Brücken - wie oben gezeigt - nicht ausgebildet,und damit tritt auch keine Anhebung des Untergrundes auf.

- In den Spektren von $(L\text{-Cys})_n$ mit Propylamin und Dipropylamin findet man eine verschobene SH-Valenzschwingung und eine geringfügige Anhebung des Untergrundes im Bereich zwischen 3000 und 1750 cm^{-1}. Außerdem wird ein intensives Kontinuum unter 1600 cm^{-1} beobachtet.

Bei Betrachtung der Kombination mit Dipropylamin ist zu bedenken, daß nur 65 Mol% an Base vorhanden waren, d.h. in einem 1:1-Gemisch wären die Intensitäten beträchtlich größer als im gezeigten Spektrum.(Abbildung 3.22.c)

Die Kombination mit Dipropylamin ist mit PT = 44 % das weitgehend symmetrische System.

- Im Spektrum von $(L\text{-Cys})_n$ mit Pyrrolidin - einem System, bei welchem sich das Proton bereits bevorzugt an der N-Base aufhält, (PT = 80 %) - findet man intensives Kontinuum zwischen 3000 und 1700 cm^{-1} mit einem bandenähnlichen Verlauf mit Maximum bei etwa 2400 cm^{-1}. Darüberhinaus wird auch unterhalb 1600 cm^{-1} ein intensives Kontinuum beobachtet.(Abbildung 3.22.d)

Bei den Systemen von $(L\text{-Cys})_n$ mit Lysidin, N-α-Benzoyl-argininamid und Methylguanidin sind die Wasserstoffbrücken - wie bereits erwähnt-länger und schwächer.

- Im $(L\text{-Cys})_n$+Lysidin-System (Abbildung 3.22.e) tritt eine breite Bande mit Maximum bei 2700 cm^{-1} auf. Unterhalb 1600 cm^{-1} wird keine kontinuierliche Absorption beobachtet. Die Symmetrie des Potentials in der zugehörigen Brücke ist mit PT = 75 % vergleichbar mit derjenigen im System $(L\text{-Cys})_n$+Pyrrolidin.(PT = 80 %)

Hiernach bringt der Unterschied von Länge bzw. Lebensdauer dieser Brücken diesen eklatanten Unterschied im spektralen Erscheinungsbild mit sich.

- Schließlich findet man in den Kombinationen von $(L\text{-Cys})_n$ mit N-α-Benzoyl-argininamid und Methylguanidin (Abbildung 3.22.f, g) keinerlei Anhebung des Untergrundes im Bereich oberhalb 1800 cm^{-1}.

Die starke Absorption bei kleinen Wellenzahlen dürfte insbesondere bei N-α-Benzoylargininamid auf die große Anzahl von Banden der Base zurückzuführen sein.

Wie bereits diskutiert, ist in beiden letzteren Fällen das Proton an der N-Base lokalisiert (PT = 100 %). Damit wird - wie erwartet- eine breite Absorptionsbande zwischen 3100 und 2600 cm^{-1} beobachtet, die dem protonierten Amin zuzuschreiben ist.(Lit.3)

All dies zeigt, daß in diesen Systemen komplizierte Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Banden und Kontinua einerseits und Symmetrie und Polarisierbarkeit der Brücken andererseits bestehen. Bestimmt werden diese Verhältnisse durch folgende Gesichtspunkte :

1) Im Hinblick darauf, daß diese Brücken sehr lang sind, ist der Potentialwall, wenn ein Doppelminimum vorliegt, sehr hoch.
2) Der hohe Wall fürt zu einer extrem hohen Polarisierbarkeit und, dadurch bedingt, erscheint eine besonders große Wechselwirkung dieser Brücken mit ihrer Umgebung denkbar.
3) Weiter ist jedoch zu bedenken, daß im Hinblick auf den hohen Wall die Protonenfluktuationsfrequenz sehr klein ist. Damit erscheint es denkbar, daß im Rahmen der Lebensdauer der Brücken keine Polarisation der Brücken mehr stattfinden kann.
4) Im Hinblick auf Länge und Schwäche der Brücken ist deren Lebensdauer sehr klein. Diese kann damit einerseits vergleichbar oder kleiner werden als die Tunnelfrequenz, andrerseits können hierdurch Relaxationsphänomene auftreten, die kontinuierliche Absorption im Bereich kleiner Wellenzahlen bewirken.

In welcher Weise diese Gesichtspunkte im einzelnen das spektrale Erscheinungsbild bestimmen, müßte durch detaillierte Messungen an derartigen Systemen unter den erwähnten Aspekten geklärt werden.

3.2.1.5. Abhängigkeit von der Hydratation :

Infolge der geringen Hydrophilie der mit Aminen bedampften $(L\text{-Cys})_n$-Filme war eine sinnvolle Hydratisierung nicht möglich. Bei den hydrophilen Filmen von $(L\text{-Cys})_n$ mit N-α-Benzoyl-argininamid und Methylguanidin dagegen lag bereits im wasserfreien Film der Protontransfer bei 100 %. Darüberhinaus werden - wie für die beiden letzteren Fälle in Abschnitt 3.2.1.2. gezeigt wurde - bei Hydratation diese Brücken aufgebrochen. Ähnliches wäre in Hinblick auf die Schwäche der S-H...N - Brücke auch bei den anderen Systemen zu erwarten.
Hierauf deuten auch die Ergebnisse der Hydratationsuntersuchungen an $(SHS)^-$-Brücken hin, die In Abschnitt 3.3.2. behandelt werden.

3.2.1.6. Konformation des Rückgrates :

- Freies $(L\text{-Cys})_n$:
  (Abbildung 3.22.h, durchgezogenes Spektrum)
  Aus der Lage der verschiedenen Amid-Banden, die in Tabelle 3.13. aufgeführt sind, ist eindeutig das Vorliegen von antiparalleler β-Struktur ersichtlich. Diese Konformation erwies sich bei $(L\text{-Cys})_n$-Filmen als völlig hydratationsunabhängig.(Vergleiche gestricheltes Spektrum in Abbildung 3.22.h)
- Natriumsalz von $(L\text{-Cys})_n$: $(L\text{-Cys}^-Na^+)_n$
  (Abbildung 3.22.i)
  Das Verschwinden der scharfen Amid-A-Bande und deren große Halbwertsbreite (Lit.31, 32) und die Lage der Amid-I-Schwingung weisen auf geknäuelte Anordnung hin.(Vergleiche Tabelle 3.13.)

Derartige geordnet - ungeordnet-Übergänge wurden auch bei anderen Polyaminosäuren mit zunehmender Ionisierung der Seitengruppen beobachtet, wie z.B. bei $(L\text{-Glu})_n$ (Lit.33), bei $(L\text{-Lys})_n$ (Lit.34), bei $(L\text{-Tyr})_n$ (Lit.35) und bei $(L\text{-His})_n$ (Lit.20) und wurden durch die wechselseitige Abstoßung gleichnamiger Ladungen erklärt.(Lit. 81)

- $(L\text{-Cys})_n$ mit Basen, die einen Protontransfer unterhalb 50 % ermöglichen:

Aus den zugehörigen Spektren in Abbildung 3.22. und den in Tabelle 3.13. aufgeführten Lagen der Amid-Banden ist ersichtlich, daß im Falle der mit N-Methyl-imidazol, Propylamin und Dipropylamin bedampften Filme ausschließlich β-Konformation vorliegt.

- $(L\text{-Cys})_n$ mit Basen, die einen Protontransfer überhalb 50 % ermöglichen:

In den Gemischen von $(L\text{-Cys})_n$ mit Lysidin und Pyrrolidin liegt, wie die entsprechenden Spektren in Abbildung 3.22. zeigen, bereits der überwiegende Anteil des Rückgrates als Knäuel vor, während in den beiden Assoziaten mit N-α-Benzoyl-argininamid und Methylguanidin vollständige Knäuelbildung eingetreten ist. (zur Lage der Amid-Banden siehe Tabelle 3.13.)

Tabelle 3.13. :

System	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})	Konformation	PT(%)
$(L\text{-}Cys)_n$	3286	1631, 1697	1520	antiparallele β	-
$(L\text{-}Cys^{-}Na^{+})_n$	3160 breit	1653	1518	Knäuel	-
$(L\text{-}Cys)_n$+N-Methyl-imidazol	3285	1630, 1697	1520	antiparallele β	0
$(L\text{-}Cys)_n$+Propyl-amin	3285	1632, 1697	1519	antiparallele β	17
$(L\text{-}Cys)_n$+Di-propylamin	3282	1629, 1698	1519	antiparallele β	44
$(L\text{-}Cys)_n$+Lysidin	3285, 3160	1625sh 1698, 1652	1518	antiparallele β+ Knäuel	75
$(L\text{-}Cys)_n$+Pyrroli-din	3286, 3160	1653, 1625sh	1518	antiparallele β+ Knäuel	80
$(L\text{-}Cys)_n$+N-α-Bz-argininamid	breite Bande(x)	breite Bande(x)	1525	Knäuel	100
$(L\text{-}Cys)_n$+ Methyl-guanidin	breite Bande	1652	1522	Knäuel	100

Anmerkung zu Tabelle 3.13 :

(x) : Überlagerung der Amid-Banden durch Banden der Base

3.2.1.7. Zusammenhang zwischen Protontransfer und Konformation :

Abbildung 3.25. zeigt den bereits erwähnten engen Zusammenhang zwischen Protontransfer und Konformationsänderung. Auffallend ist, daß auch hinsichtlich der Konformationsumwandlung das System $(L\text{-}Cys)_n$+Lysidin insofern aus dem Rahmen fällt, als es trotz des relativ hohen pk_a-Wertes der N-Base zuwenig Anteil an Knäuel im Rückgrat von $(L\text{-}Cys)_n$ verursacht. Der entsprechende Messpunkt liegt in Abbildung 3.25. deutlich neben der punktierten Linie. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit dem bereits oben erwähnten relativ geringen Ausmaß des Protontransfers.

Weiterhin zeigt Abbildung 3.25., daß die Umwandlung des Rückgrates von antiparalleler β-Struktur zum Knäuel der Protontransferkurve etwas nacheilt. Dabei weist die Steilheit der Umwandlungskurve auf ein hohes Maß an Kooperativität bei der Konformationsänderung hin. Dieses kooperative Verhalten scheint sich im vorliegenden System auch dem Verlauf der Protontransferkurve aufzuprägen, was aus deren Aufsteilung ersichtlich ist, etwa im Vergleich zu der Kombination von $(L\text{-Lys})_n$ mit Chlorphenolen.(Abbildung 3.4.) Offensichtlich liegt also eine enge Kopplung zwischen Protontransfer und Konformationsänderung vor.

3.2.2. Poly-L-Cystein + Poly-L-Lysin :

Als Polymer-Polymer-Analogon zu den $(L\text{-Cys})_n$+N-Base-Systemen bot sich die Kombination von $(L\text{-Cys})_n$ mit $(L\text{-Lys})_n$ an. Der pk_a-Wert von 10,44 für $(L\text{-Lys})_n$ (Lit.38) legt vor allem einen Vergleich der Polymer-Polymer-Kombination mit dem $(L\text{-Cys})_n$+Propylamin - Assoziat nahe aufgrund ähnlicher Δpk_a-Verhältnisse.

In den vorliegenden Untersuchungen kam $(L\text{-Cys})_n$ mit n = 44 zur Verwendung, während sowohl ein langkettiges $(L\text{-Lys})_n$ mit n = 2286 als auch ein kurzkettiges mit n = 60 benutzt wurde.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede bei Verwendung von $(L\text{-Lys})_n$-Proben verschiedener Kettenlänge.

3.2.2.1. Indizien für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken :

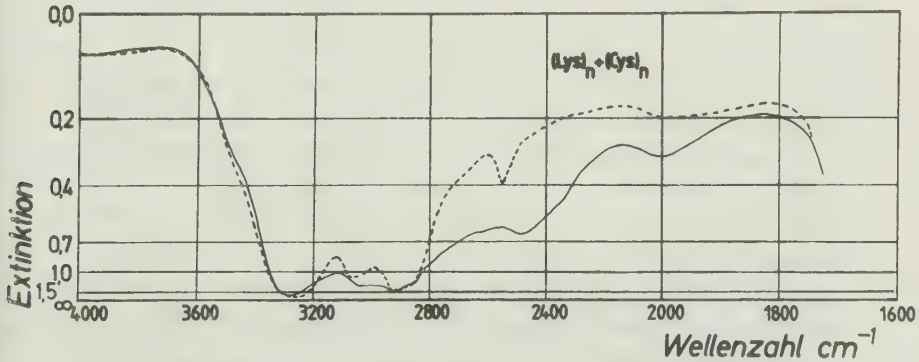


Abbildung 3.27. : Teilspektrum eines $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$-Gemisches großer Schichtdicke
(——) : Gemessenes Spektrum
(- - -): Summenspektrum aus einem isolierten $(L\text{-Lys})_n$- und einem $(L\text{-Cys})_n$-Film

Die durchgezogene Linie in Abbildung 3.27. zeigt ein in der Abszisse gedehntes Spektrum eines getrockneten $(L\text{-Cys})_n$+$(L\text{-Lys})_n$-Filmes von hoher Schichtdicke (39+39 µVal) im Wellenzahlenbereich zwischen 4000 und 1800 cm^{-1} im Vergleich zum gestrichelt gezeichneten Summenspektrum der beiden isolierten Komponenten der jeweils gleichen Menge von 39 µVal.
Dabei fällt folgendes auf:
Anstelle der scharfen SH-Valenzschwingung bei 2552 cm^{-1} im Summenspektrum beobachtet man im 1:1-Assoziat-Spektrum eine breite Bande mit Maximum bei 2510 cm^{-1}, die sich einer Anhebung des Untergrundes im gesamten Bereich von 3200 bis 1800 cm^{-1} überlagert.
Der Vergleich mit dem Summenspektrum zeigt somit, daß sich Wasserstoffbrücken vom Typ $S\text{-}H\ldots N \rightleftharpoons S^-\ldots H\text{-}N^+$ zwischen den Seitengruppen im 1:1-Assoziat ausgebildet haben.

Ein Vergleich der beobachteten Verschiebung von 42 cm^{-1} mit dem Wert von 28 cm^{-1}, der für die analoge Kombination von $(L\text{-Cys})_n$ mit Propylamin ermittelt worden war (Abschnitt 3.2.1.2.), zeigt, daß trotz des mit 10,44 für $(L\text{-Lys})_n$ im Vergleich zum Propylamin etwas niedrigeren pK_a-Wertes im Polymer-Polymer-Assoziat offensichtlich kräftigere Wasserstoffbrücken mit kürzerer Bindungslänge ausgebildet werden.

3.2.2.2. Ermittlung des Protontransfers im $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$-Assoziat :

3.2.2.2.1. Die zur Auswertung herangezogene Bande :

Zur Ermittlung des Gleichgewichtes zwischen den beiden Grenzstrukturen $Cys\text{-}SH\ldots N\text{-}Lys \rightleftharpoons Cys\text{-}S^-\ldots{}^+HN\text{-}Lys$ diente eine nur in den Spektren der protonierten Form von $(L\text{-Lys})_n$ auftretende Bande.
Es zeigte sich jedoch, daß die Lage des Absorptionsmaximums dieser Bande je nach Art des verwendeten Protondonors relativ stark variierte. So verschob sich die Lage des Maximums, beginnend bei $(L\text{-Lys}\cdot HJ)_n$ von 1152 cm^{-1} bis nach 1180 cm^{-1} in der Kombination von $(L\text{-Lys})_n$ mit $(L\text{-Glu})_n$.
Die Verhältnisse sind in Tabelle 3.14. aufgeführt.

Tabelle 3.14. :

Substanz	$\gamma_{NH_3^+}$ (cm^{-1})
$(L\text{-Lys}\cdot HJ)_n$	1152
$(L\text{-Lys}\cdot HBr)_n$	1155
$(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$	1165
$(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Glu})_n$	1180

Abbildung 3.28 zeigt die erwähnte Bande von $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$ mit einer Schulter bei 1135 cm^{-1} (durchgezogen) und die entsprechende Bande von $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Glu})_n$ (gestrichelt) im Vergleich zum Verlauf bei $(L\text{-Lys})_n$ (punktiert)

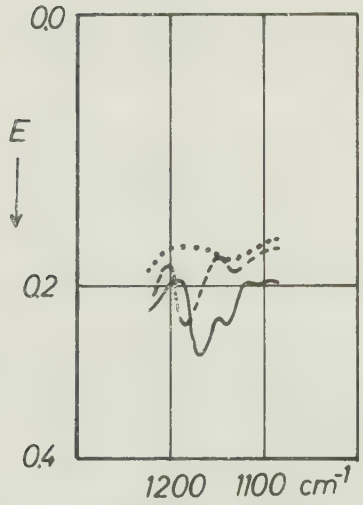


Abbildung 3.28. :

γNH_3^+-Schwingung von protoniertem, brückengebundenen $(L\text{-Lys})_n$

(——) : $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$

(- - -): $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Glu})_n$

(....) : $(L\text{-Lys})_n$ zum Vergleich

Die gleiche Bande fand König (Lit.42) an $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$-Filmen ebenfalls in diesem Bereich und ordnete sie einer Rocking-Schwingung (γ) der protonierten ε-Aminogruppe von Lysin zu. Eine analoge Zuordnung findet sich auch bei Tsuboi(Lit.43) für die NH_3^+-Gruppe von Glycin.

Mit dieser Zuordnung in Einklang ist die hier beobachtete Verschiebung des Absorptionsmaximums mit der Art des jeweiligen Säureanions, da bekanntlich X-H - Deformationsschwingungen brückengebundener Gruppierungen von der Natur des Protonacceptors abhängen, und zwar erfolgt eine Verschiebung der X-H - Deformationsschwingung nach höheren Wellenzahlen bei zunehmender Protonacceptorstärke des Anions. (Lit.15, 44)

Da die Protonacceptorstärke in der Reihe $J^- < Br^- < Cl^- < CO_2^-$ zunimmt, (Lit. 45-48) erscheint die beobachtete Verschiebung der $\gamma_{NH_3^+}$ -Schwingung plausibel.

In den Spektren des Assoziates von $(L\text{-Lys})_n$ mit $(L\text{-Cys})_n$ erscheint die $\gamma_{NH_3^+}$ -Bande bei 1170 cm^{-1} und liegt damit um 10 cm^{-1} unterhalb des Wertes für $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Glu})_n$ und nur wenig überhalb des für $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$ erhaltenen Wertes bei 1165 cm^{-1}.

Es konnte nun durch Ermittlung der Extinktionskoeffizienten der $\gamma_{NH_3^+}$ - Bande von protoniertem $(L\text{-Lys})_n$ in den verschiedenen, in Tabelle 3.14. aufgeführten Systemen gezeigt werden, daß deren Größe nur im Rahmen von maximal 20 %, abhängig von der Art der Brücke variiert.
Dabei wurde allerdings bei den $(L\text{-Lys}\cdot HX)_n$-Filmen eine starke Abhängigkeit von der jeweiligen Proteinkonformation festgestellt, was im folgenden aber ohne Bedeutung ist, da im Zusammenhang mit der Bestimmung des Protontransfers im System $(L\text{-Cys})_n$+$(L\text{-Lys})_n$ nur Systeme mit einer einzigen Konformation, nämlich mit α-helikaler Struktur verglichen wurden.

Die vergleichbaren Absorptionsfrequenzen der $\gamma_{NH_3^+}$ -Schwingung von $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$-Filmen (1165 cm^{-1}) und von $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$-Assoziaten legen in etwa ähnliche Protonacceptoreigenschaften des wasserstoff-verbrückten Cl^- - Anions und der Sulfid-Gruppe von $(L\text{-Cys})_n$ nahe.
Deshalb erschien es gerechtfertigt, zur Bestimmung des Protontransfers in $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$-Filmen die Intensität der $\gamma_{NH_3^+}$ -Schwingung in den Spektren von $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$-Filmen mit variablen HCl-Gehalten zu Eichzwecken heranzuziehen. Dies insbesondere auch deshalb, weil - wie bereits oben erwähnt - die Extinktionskoeffizienten der $\gamma_{NH_3^+}$ - Banden selbst bei sehr unterschiedlichen Protonacceptoren nur maximal um 20 % differieren.

Weiterhin zeigte sich, daß die Lage der $\gamma_{NH_3^+}$ -Schwingung in $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$-Filmen unabhängig von der Hydratation ist.
Diese Unabhängigkeit gilt auch für den Extinktionskoeffizienten.
Dies ist wichtig in Hinblick auf die Bestimmung des Protontransfers im $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$-System bei Hydratation.

3.2.2.2.2. Bestimmung des Protontransfers mit Hilfe der $\gamma_{NH_3^+}$ - Bande :

In Abbildung 3.29. ist in durchgezogener Linie die mit dreifacher Ordinatendehnung aufgenommene $\gamma_{NH_3^+}$ -Bande eines wasserfreien $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$-Filmes gezeigt, während die gestrichelt gezeichnete Bande nach Hydratation bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit aufgenommen wurde.

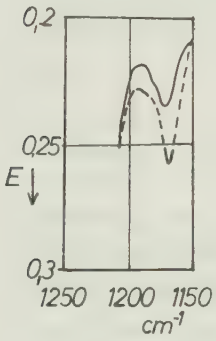


Abbildung 3.29. :
$\gamma_{NH_3^+}$ - Bande eines $(L\text{-Lys})_n$+$(-Cys)_n$-Assoziates (3-fach gedehnt)
(——) : wasserfrei
(- - -): nach Hydratation bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit

Das dazugehörige Gesamtspektrum ist in Abbildung 3.30. gezeigt.

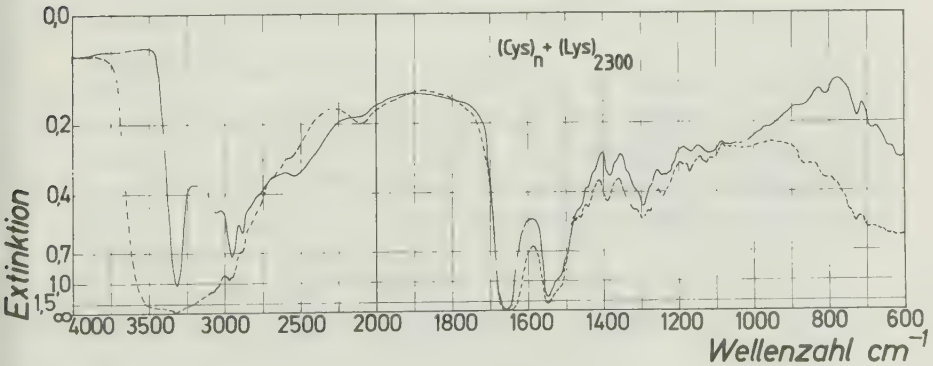


Abbildung 3.30. : 1:1-Assoziat von $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$
(——) : wasserfrei
(- - -): nach Hydratation bei 90 % rel. Luftfeuchte

Im Hinblick darauf, daß die Intensität der Bande nicht nur vom Protontransfer, sondern geringfügig auch direkt von der Natur des Protonacceptors abhängt, wie in Abschnitt 3.2.2.2.1. gezeigt wurde, ist der erhaltene Wert für den Protontransfer mit einem beträchtlichen Fehler behaftet, und wurde zu PT = 50 $\pm$ 15 % für trockene Filme bestimmt.
Aus diesem Wert ist auf weitgehende Symmetrie der S-H...N - Brücke im Assoziat zu schließen.
Interessant in diesem Zusammenhang ist ein Vergleich mit dem an der Kombination von $(L\text{-}Cys)_n$ mit Propylamin erhaltenen Ergebnis, wo trotz eines geringfügig höheren pK_a-Wertes von Propylamin der Protontransfer zu lediglich 17 % bestimmt worden war.
Diese Diskrepanz korelliert aber gut mit der in Abschnitt 2.2.2.2. aus der unterschiedlichen Verschiebung der SH-Valenzschwingung gefolgerten Annahme über die im Vergleich zum $(L\text{-}Cys)_n$+Propylamin-Assoziat kräftigeren Wasserstoffbrücken im $(L\text{-}Lys)_n$+$(L\text{-}Cys)_n$-Gemisch.

3.2.2.3. Kontinuierliche Absorption :

Aufgrund der - wie oben gezeigt - weitgehenden Symmetrie sind diese Brücken leicht polarisierbar.(Lit.50)
Bezüglich des eventuell zu erwartenden Kontinuums werden im folgenden aufgrund des vergleichbaren Protontransfers die Spektren von $(L\text{-}Lys)_n$+$(L\text{-}Cys)_n$ in Abbildung 3.27. und von $(L\text{-}Cys)_n$+Dipropylamin in Abbildung 3.22.c) miteinander verglichen.
Bedenkt man, daß im $(L\text{-}Lys)_n$+$(L\text{-}Cys)_n$-Spektrum in Abbildung 3.27. etwa die 4-fache Schichtdicke vorliegt wie beim $(L\text{-}Cys)_n$+Dipropylamin-Film, so sieht man, daß im Bereich zwischen 3000 und 1700 cm^{-1} in beiden Fällen eine schwache Anhebung des Untergrundes beobachtbar ist.
Demgegenüber wird bei $(L\text{-}Lys)_n$+$(L\text{-}Cys)_n$ im Gegensatz zum Dipropylamin-Assoziat unterhalb 1600 cm^{-1} keine Anhebung beobachtet, wie der Vergleich von Abbildung 3.30. und 3.22.c) zeigt.
Der Unterschied könnte auf die längere Lebensdauer der Brücken im Polymer-Polymer-Assoziat zurückzuführen sein.

3.2.2.4. Einfluß der Hydratation :

- Menge an angelagertem Wasser :

In Abbildung 3.30. (gestrichelt) ist das Spektrum eines bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit hydratisierten $(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$-Assoziatfilmes zu sehen. Die Intensität der Valenzschwingung des angelagerten Wassers läßt dabei auf einen Gehalt von 2-3 Molekülen Wasser pro Säure-Base-Paar schließen. Somit erwiesen sich diese Filme als relativ hydrophil.

- Einfluß auf die Brückenbildung :

Abbildung 3.30. zeigt, daß die im trockenen Assoziat beobachtbare breite Absorption zwischen 2600 cm^{-1} und etwa 2200 cm^{-1} mit der überlagerten, nach 2510 cm^{-1} verschobenen SH-Valenzschwingung im hydratisierten Fall nicht mehr wahrnehmbar ist.
Stattdessen beobachtet man eine schwache Schulter bei etwa 2535 cm^{-1}, d.h. mit Maximum zwischen der Lage der γ_{SH}-Schwingung von freien SH-Gruppen und von mit N-Basen verbrückten SH-Gruppen.

Das Verschwinden der breiten Absorption zwischen 2600 und 2200 cm^{-1} deutet darauf hin, daß bei Hydratation die Wasserstoffbrücken weitgehend dissoziiert sind. Dies ist plausibel, da es sich um schwache geladene Brücken handelt, wie unten gezeigt werden wird.
Die bei 2535 cm^{-1} auftretende Bande ist hiernach vermutlich SH-Gruppen zuzuschreiben, die mit Wasser verbrückt sind.

- Zunahme des Protontransfers :

Auf eine Zunahme des Protontransfers kann aus einer Intensitätszunahme der in Abschnitt 2.2.3.1. erwähnten $\gamma_{NH_3^+}$-Schwingung der protonierten ε-Aminogruppen geschlossen werden.
Die beim Trocknen reversible starke Intensitätszunahme der $\gamma_{NH_3^+}$-Schwingung bei Hydratation ist in Abbildung 3.29. gestrichelt gezeigt.
Da sich, wie bereits in Abschnitt 3.2.2.2.1. gezeigt wurde, Lage und die Intensität der $\gamma_{NH_3^+}$-Schwingung bei den zu Eichzwecken herangezogenen Spektren von $(L\text{-Lys}\cdot HCl)_n$-Filmen als hydratationsunabhängig erwiesen, und überdies auf weitgehend vergleichbare Acceptorstärke von Cl^- - Ionen und Sulfidgruppierung geschlossen wurde, kann angenommen werden, daß sich die Bandenintensität nur durch Verschiebung des Protontransfergleichgewichtes ändert.

Die Auswertung der $\gamma_{NH_3^+}$-Bande lieferte einen Wert für den Protontransfer im hydratisierten Zustand von PT = 80-90 %.
Daß kein vollständiger Protontransfer eintritt, wird durch die bereits oben erwähnte schwache Schulter bei 2535 cm^{-1} der vermutlich an Wasser gebundenen SH-Gruppen bestätigt.

Es liegt also zwar ein fast vollständiger Protontransfer vor, aber - wie bereits diskutiert - die Seitengruppen sind nicht mehr über Wasserstoffbrücken verknüpft, sondern liegen als solvatisierte Ionen vor.

3.2.2.5. Konformation des $(L\text{-}Lys)_n$+$(L\text{-}Cys)_n$-Assoziates :

3.2.2.5.1.Verwendung von kurzkettigem $(L\text{-}Lys)_n$:

In Abbildung 3.31. ist gestrichelt das Spektrum eines Assoziatfilmes von $(L\text{-}Cys)_n$ mit $(L\text{-}Lys)_n$ der Kettenlänge n = 60 im Bereich von Amid-I- und Amid-II-Bande gezeigt.

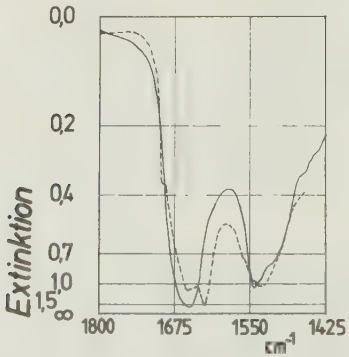


Abbildung 3.31. :
Konformation von $(L\text{-}Cys)_n$+$(L\text{-}Lys)_n$-Assoziaten mit verschiedenen Kettenlängen von $(L\text{-}Lys)_n$

(——) : n_{Lys} = 2286
(- - -): n_{Lys} = 60

Deutlich ist das Maximum der Amid-I-Bande bei 1623 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1692 cm^{-1} zu erkennen. Dies und die Lage der Amid-II-Bande bei 1535 cm^{-1} deuten auf einen überwiegenden Anteil an antiparalleler β-Struktur hin.
Eine Schulter der Amid-I-Bande bei 1651 cm^{-1} läßt daneben auf die Existenz von einem helikalen Anteil schließen.
Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung damit, daß sowohl isolierte $(L\text{-}Cys)_n$-Filme als auch kurzkettige $(L\text{-}Lys)_n$-Filme in antiparalleler β-Struktur vorliegen, wie in den vorigen Abschnitten gezeigt wurde.

Allerdings zeigt ein genauer Vergleich der Lagen der verschiedenen Amid-Banden des Assoziatspektrums mit denen von $(L\text{-Cys})_n$ und kurzkettigem $(L\text{-Lys})_n$, daß im Assoziatspektrum beinahe exakt die Wellenzahlen von $(L\text{-Lys})_{60}$ realisiert sind, während die Werte für $(L\text{-Cys})_n$ im Rahmen des für antiparallele β-Struktur gegebenen Spielraumes deutlich abweichen.
Diese Verhältnisse werden aus Tabelle 3.15. deutlich.

Tabelle 3.15. :

Substanz	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})	Konformation
$(L\text{-Cys})_n$	3286	1631, 1697	1520	antiparallele β
$(L\text{-Lys})_{60}$	3271	1623, 1692, 1651sh	1535	antiparallele β + wenig α Helix
$(L\text{-Lys})_{60}$ + $(L\text{-Cys})_n$	3269	1623, 1694, 1651	1532	überwiegend antiparallele β + α-Helix

Dieser Befund läßt die Vermutung zu, daß im Rahmen der durch die β-Struktur gesetzten Grenzen im Assoziatspektrum die spezifischen strukturellen Eigenschaften des $(L\text{-Lys})_{60}$-Rückgrates dominierend sind, und daß sich das $(L\text{-Cys})_n$-Rückgrat entsprechend den durch die $(L\text{-Lys})_{60}$-Struktur vorgegebenen konformativen Anforderungen anordnet.
Diese Vermutung wird weiter gestützt durch die am Assoziat von $(L\text{-Cys})_n$ mit langkettigem $(L\text{-Lys})_n$ gewonnenen Ergebnisse.

3.2.2.5.2. Verwendung von langkettigem $(L\text{-Lys})_n$:

In Abbildung 3.31. ist in durchgezogener Linie das Spektrum eines Assoziatfilmes von $(L\text{-Cys})_n$ mit $(L\text{-Lys})_n$ der Kettenlänge n = 2286 im Bereich von Amid-I- und Amid-II-Bande gezeigt.
Deutlich ist die Lage der Amid-I-Bande bei 1651 cm^{-1} und die der Amid-II-Bande bei 1544 cm^{-1} zu erkennen. Diese Werte zeigen das

Vorliegen von reiner α-helikaler Struktur, ebenso wie in den Filmen von langkettigem $(L\text{-Lys})_n$ an.
Ein Vergleich der Lagen der verschiedenen Amid-Banden des Assoziatspektrums mit denen von freien $(L\text{-Cys})_n$-bzw. $(L\text{-Lys})_n$-Spektren entsprechender Kettenlänge zeigt auch hier wiederum nahezu identische Bandenlagen im Assoziatspektrum und im Spektrum von langkettigem $(L\text{-Lys})_n$.
Dies wird aus Tabelle 3.16. ersichtlich :

Tabelle 3.16. :

Substanz	Amid A (cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})	Konformation
$(L\text{-Cys})_n$	3286	1631, 1697	1520	antiparallele β
$(L\text{-Lys})_{2286}$	3292	1650	1544	α-Helix
$(L\text{-Cys})_n$ + $(L\text{-Lys})_{2286}$	3286	1651	1544	α-Helix

Das im Assoziat alleinige Vorliegen von α-helikaler Struktur und die Nichtexistenz der von freiem $(L\text{-Cys})_n$ bevorzugten β-Struktur bestätigt die am kurzkettigen System geäußerte Vermutung über die Dominanz der strukturellen Eigenschaften von $(L\text{-Lys})_n$ gegenüber denen von $(L\text{-Cys})_n$.
Mit der Dominanz des $(L\text{-Lys})_n$-Rückgrates ist auch in Übereinstimmung, daß die Assoziatfilme bei Hydratisierung, wo annähernd vollständiger Protontransfer vorliegt, nicht in die geknäuelte Konformation übergehen, wie dies aufgrund der geknäuelten Anordnung von $(L\text{-Cys}^{-}Na^{+})_n$-Filmen (Vergleiche Abschnitt 3.2.1.2.) erwartet werden könnte.

4. Ergebnisse an strukturymmetrischen Wasserstoffbrücken :

- Allgemeines :

Unter diese Kategorie fallen über eine Wasserstoffbrücke verknüpfte 1:1- Assoziate einer Säure und ihrer konjugierten Base. Es existieren sowohl kationische Komplexe vom Typ $(XHX)^+$, wobei X z.B. eine Aminogruppe repräsentiert, und anionische Komplexe vom Typ $(YHY)^-$, in denen Y z.B. eine Carboxylatgruppe darstellt. Voraussetzung für die vollständige Bildung derartiger Komplexe ist die Anwesenheit eines nicht oder nur schlecht zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigten Gegenions.
Hierfür eignen sich besonders Perchlorat-Anionen bzw. Tetra-alkyl-ammonium-Kationen.
Untersuchungen an derartigen monomeren Systemen sind bereits in großer Zahl vor allem an $(OHO)^-$-Brücken in Carbonsäure-Carboxylat-Assoziaten und an $(NHN)^+$-Brücken in Amin-Amin-Perchlorat-Komplexen bekannt.(Lit. 84-88)

Dagegen liegen nur sehr wenige Untersuchungen an analogen strukturymmetrischen Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen von Polyaminosäuren vor. Lediglich die strukturymmetrische $(NHN)^+$-Brücke zwischen den Imidazolresten von $(L\text{-His})_n$ wurde untersucht. (Lit.51)

Bei derartigen Systemen ist vor allem von Interesse, ob
1) eine Kopplung zwischen der Ausbildung von Wasserstoffbrücken und der Peptid-Konformation vorliegt, und ob
2) die Ausbildung von Brücken durch geometrische Restriktionen des Peptidrückgrates verhindert wird.
Darüberhinaus interessiert
3) die Frage nach der Stabilität derartiger strukturymmetrischer Brücken hinsichtlich Dissoziation bei Hydratation.

- Übersicht über die untersuchten Systeme :

Die hier untersuchten homokonjugierten Systeme sind in Tabelle 4.1. aufgeführt.
Die Herstellung der entsprechenden Filme aus der jeweiligen Polyaminosäure durch variable Säure- bzw. Basenzugabe ist in Abschnitt 2.3. beschrieben.

Tabelle 4.1. :

Substanz	Art der Brücke	Bezeichnung
$(L\text{-}Lys)_n+(L\text{-}Lys\cdot HClO_4)_n$	$(N\text{-}H\ldots N)^+$	Poly-L-Lysin-Semi-perchlorat
$(L\text{-}Cys)_n+(L\text{-}Cys^-NEt_4^+)_n$	$(S\text{-}H\ldots S)^-$	Poly-L-Cystein-Semi-tetraäthylammonium-salz
$(L\text{-}Glu)_n+(L\text{-}Glu^-NEt_4^+)_n$	$(O\text{-}H\ldots O)^-$	Poly-L-Glutaminsäure-Semi-tetraäthyl-ammoniumsalz
$(L\text{-}Asp)_n+(L\text{-}Asp^-NEt_4^+)_n$	$(O\text{-}H\ldots O)^-$	Poly-L-Asparaginsäure-Semi-tetraäthyl-ammoniumsalz

4.1. Poly-L-Lysin-Semiperchlorat :

4.1.1. Kontinuierliche Absorption als Indikator für Ausbildung von $(NHN)^+$-Brücken :

In Abbildung 4.1. sind die Spektren von $(L\text{-}Lys)_n$-Filmen mit variablem $(L\text{-}Lys)_n$ zu $(L\text{-}Lys\cdot HClO_4)_n$-Verhältnis abgebildet. Deutlich ist mit zunehmendem $HClO_4$-Gehalt der Filme zunächst ein Intensitätszuwachs einer kontinuierlichen Absorption im Bereich von 3000 bis 1700 cm^{-1} zu beobachten, während im Bereich unterhalb 1700 cm^{-1} keine Veränderung des Untergrundes mit der Protonierung zu beobachten ist.
Der Verlauf der kontinuierlichen Absorption bei 1850 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Anzahl an zugegebenen $HClO_4$-Äquivalenten ist in Abbildung 4.2. dargestellt.

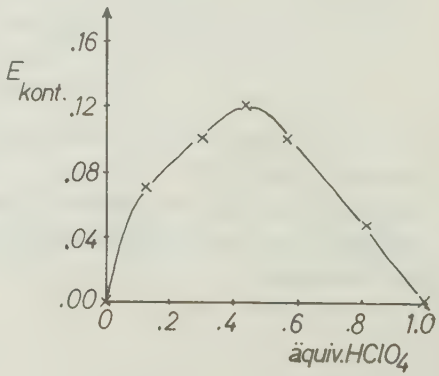


Abbildung 4.2. :
Abhängigkeit der kontinuierlichen Absorption bei 1850 cm^{-1} im System $(L\text{-}Lys)_n+HClO_4$ vom $HClO_4$-Gehalt

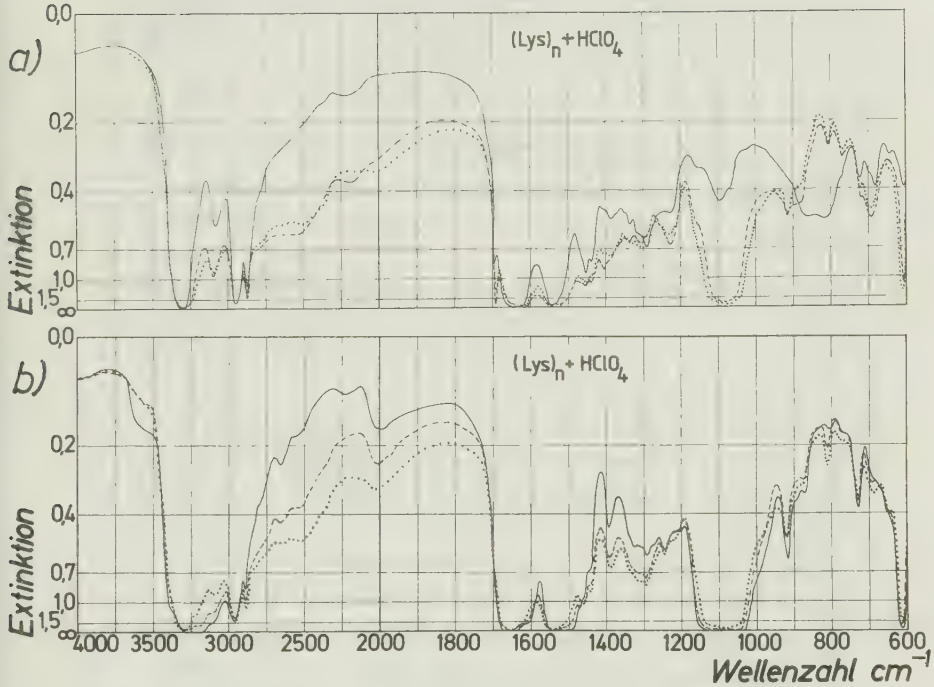


Abbildung 4.1. : Spektren von $(L\text{-Lys})_n$+$HClO_4$ bei verschiedenen $HClO_4$-Gehalten in hoher Schichtdicke

Abbildung a): (——) : Freies $(L\text{-Lys})_n$

(- - -): $(L\text{-Lys})_n$+0,32 Äquivalente $HClO_4$

(. . .): $(L\text{-Lys})_n$+0,42 Äquivalente $HClO_4$

Abbildung b) (. . .): $(L\text{-Lys})_n$+0,59 Äquivalente $HClO_4$

(- - -): $(L\text{-Lys})_n$+0,81 Äquivalente $HClO_4$

(——) : $(L\text{-Lys})_n$+1,00 Äquivalente $HClO_4$

Die Spektren in Abbildung 4.1. und insbesondere Abbildung 4.2. zeigen, daß nach dem Überschreiten eines Wertes von 0,42 Mol-Äquivalenten an $HClO_4$ -bezogen auf die Anzahl der ε-Aminogruppen - eine mit weiterer $HClO_4$-Zugabe korellierte Abnahme der kontinuierlichen Absorption erfolgt.

Bei Vollprotonierung findet man wieder die gleiche Intensität der Absorption wie bei der freien Polybase $(L\text{-Lys})_n$.

Das Auftreten derartiger kontinuierlicher Absorption ist charakteristisch für die Ausbildung von $(NHN)^+$-Brücken, wie an verschiedenen Systemen bereits früher gezeigt werden konnte.
So wurden ebenso wie in semiprotonierten $(L\text{-His})_n$-Filmen (Lit.51) ähnliche Effekte auch in 1:1-Gemischen von N-Heterocyclen und deren Perchloraten beobachtet.(Lit.52,84,85,86)
Darüberhinaus zeigt Abbildung 4.1., daß in den Spektren mit intensiver kontinuierlicher Absorption eine kräftige Bande bei etwa 2540 cm^{-1} zu beobachten ist.
Eine bandenartige Struktur des IR-Kontinuums im Wellenzahlenbereich zwischen etwa 3000 und 1700 cm^{-1} deutet, wie mit Modellrechnungen gezeigt wurde (Lit.29) auf relativ lange Wasserstoffbrücken hin. (Vergleiche hierzu auch Abbildung 3.7.)
Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit kristallographischen Daten für homokonjugierte Pyrazin- und Triäthylen-diamin-Komplexe, wo relativ große Bindungslängen von 2,85 bzw. 2,84 A gefunden wurden.(Lit.57, 88)
Im Hinblick auf vergleichbare Acceptorstärke wäre für $(NHN)^+$-Brükken im $(L\text{-Lys})_n$-System eine ähnliche Brückenlänge zu erwarten.

Vergleicht man aber dieses Ergebnis mit den Untersuchungen an analogen $(NHN)^+$-Brücken in $(L\text{-His})_n$-Filmen (Lit.51), so sieht man, daß in diesem Fall das IR-Kontinuum, wenn auch mit schwächerer Intensität bei kleineren Wellenzahlen ebenfalls auftritt.
Dieser Unterschied wird verständlich unter der Berücksichtigung, daß in derartigen Systemen die $(NHN)^+$-Brücken etwas kürzer sind.
So wurde für den homokonjugierten Komplex von Imidazol die N-N-Brückenlänge zu 2,73 A bestimmt.(Lit.54)
Die Theorie zeigt, daß mit abnehmender Brückenlänge die Kontinua auch im Bereich unterhalb 1700 cm^{-1} an Intensität gewinnen.(Lit.29)

4.1.2. Prozentsatz an ausgebildeten $(NHN)^+$-Brücken :

Aus Abbildung 4.2. ist ersichtlich, daß die kontinuierliche Extinktion ihre maximale Intensität nicht - wie theoretisch zu erwarten wäre - bei 0,5 Äquivalenten $HClO_4$, sondern bereits früher, nämlich bei einem Wert von 0,42 Äquivalenten erreicht.
Hieraus ist zu schließen, daß lediglich ca. 85 % der verfügbaren

ε -Aminogruppen an der Brückenbildung beteiligt sind. Offensichtlich ist die Beteiligung der restlichen 15 % durch sterische Restriktionen des Peptid-Rückgrates unmöglich gemacht.

4.1.3. Einfluß der Hydratation auf die Dissoziation :

Die Begünstigung der Dissoziation von strukturunsymmetrischen Wasserstoffbrücken durch Wasser wurde bereits in den vorigen Abschnitten diskutiert.
Im Falle der $(NHN)^+$-Brücken läßt sich die Dissoziation in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad sehr gut anhand der Abnahme der kontinuierlichen Absorption zwischen 3000 und 1750 cm^{-1} verfolgen.
Dies ist in Abbildung 4.3. am Spektrum eines $(L\text{-Lys})_n$-Filmes, der mit 0,42 Äquivalenten an $HClO_4$ versetzt war, bei verschiedenen Hydratationsgraden gezeigt.
Zum Vergleich ist dort strichpunktiert das Spektrum eines voll protonierten $(L\text{-Lys}\cdot HClO_4)_n$-Filmes eingezeichnet, wo naturgemäß keine kontinuierliche Absorption beobachtet wird.

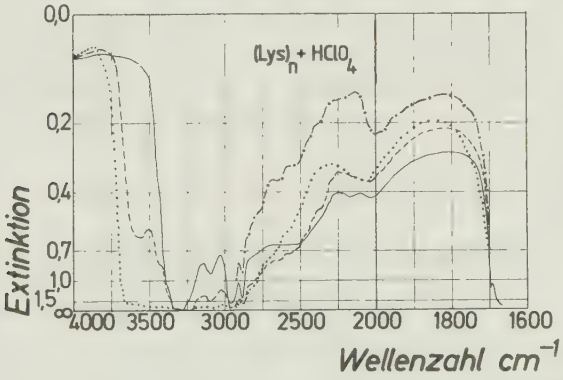


Abbildung 4.3. : Abhängigkeit der kontinuierlichen Absorption eines mit 0,42 Äquivalenten $HClO_4$ versehenen $(L\text{-Lys})_n$-Filmes von der Hydratation.

(———) : Wasserfreier Film
(- - -): 0,5 Moleküle H_2O pro Lysinrest
(. . .): 3,8 Moleküle H_2O pro Lysinrest
(-.-.-): Zum Vergleich ein voll protonierter $(L\text{-Lys}\cdot HClO_4)_n$-Film

Aus Abbildung 4.3. ist zu erkennen, daß mit zunehmender Hydratation - ersichtlich aus der Intensität der γ_{OH}-Schwingung des angelagerten Wassers bei 3540 cm^{-1} - die Intensität der kontinuierlichen Absorption unterhalb 2400 cm^{-1} deutlich abnimmt.
Im Bereich um 2100 cm^{-1} wird der erwähnte Effekt etwas überdeckt durch das mit zunehmender Hydratation intensivere Auftreten einer Bande, die einer Kombinationsschwingung des Wassers zugeordnet wurde.(Lit.58)

Unter Zuhilfenahme des Wertes der kontinuierlichen Absorption des wasserfreien Filmes in Abbildung 4.3. (———), in dem - wie gezeigt wurde - 85 % der ε-Aminogruppen verbrückt sind, und des vollprotonierten Filmes (-.-.-) mit 0 % Brückenbildung als Eichpunkte konnte aus der Intensität der kontinuierlichen Absorption bei 1850 cm^{-1} der Prozentsatz an ausgebildeten Wasserstoffbrücken in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad ermittelt werden.
Das Ergebnis hiervon ist in Abbildung 4.4. gezeigt.
Dabei wurde die einer bestimmten relativen Luftfeuchtigkeit entsprechende Anzahl von gebundenen Wassermolekülen mit Hilfe der Adsorptionswaage bestimmt, die in Abschnitt 2.4. beschrieben wurde.

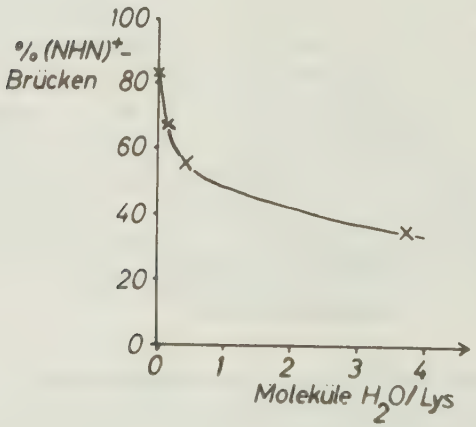


Abbildung 4.4. : Abnahme des Prozentsatzes an ausgebildeten $(NHN)^+$-Wasserstoffbrücken in Abhängigkeit vom angelagerten Wasser

Abbildung 4.4. zeigt, daß bei Anlagerung von einem Wassermolekül pro Lysinrest, d.h. bei näherungsweise zwei Wassermolekülen pro $(NHN)^+$-Wasserstoffbrücke der Anteil an ausgebildeten Brücken von 85 auf 46 %, also beinahe auf die Hälfte abgesunken ist, während weitere Wasserzugabe nur noch relativ geringe Auswirkungen auf die Dissoziation der Brücken hat.
Eine qualitative Extrapolation des Kurvenverlaufes zeigt, daß vollständige Dissoziation der $(NHN)^+$-Brücken erst bei einer relativ großen Anzahl von Wassermolekülen pro Aminosäurerest eintritt. Demgemäß ist zu erwarten, daß in wässrigen Lösungen die Brücken vom Typ $(NHN)^+$ weitgehend dissoziiert sein dürften.

4.1.4. Konformation des Rückgrates :

Für die beschriebenen Untersuchungen wurde $(L\text{-Lys})_n$ der Kettenlänge n = 192 verwendet, welches, wie in Abschnitt 3.1.1.5. beschrieben wurde, nach längerer Hydratation irreversibel in die antiparallele β-Struktur übergeht.
Die in den verschiedenen $(L\text{-Lys})_n$+$HClO_4$-Spektren in Abbildung 4.1. zum Teil sichtbaren unterschiedlichen Konformationen - ersichtlich an der β-spezifischen scharfen Bande bei 1692 cm^{-1} - sind somit auf die unterschiedliche Vorbehandlung der Filme zurückzuführen und zeigen keinen systematischen Gang.

4.2. Poly-L-Cystein-Semi-tetraäthylammoniumsalz :

4.2.1. Kontinuierliche Absorption $E_{kont.}$:

4.2.1.1. Als Indikator für Ausbildung von $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken :

Abbildung 4.5. zeigt die Spektren von $(L\text{-Cys})_n$-Filmen, die mit variablen Mengen an Tetraäthylammoniumhydroxid versetzt worden waren und nach dem Eintrocknen somit einen entsprechenden Anteil an $(Cys^-)_n$ besaßen.
Deutlich ist mit zunehmendem Basengehalt zunächst die Zunahme einer kontinuierlichen Absorption im Bereich zwischen ca. 2600 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} mit bandenähnlichem Verlauf bei 2200 cm^{-1} zu beobachten.

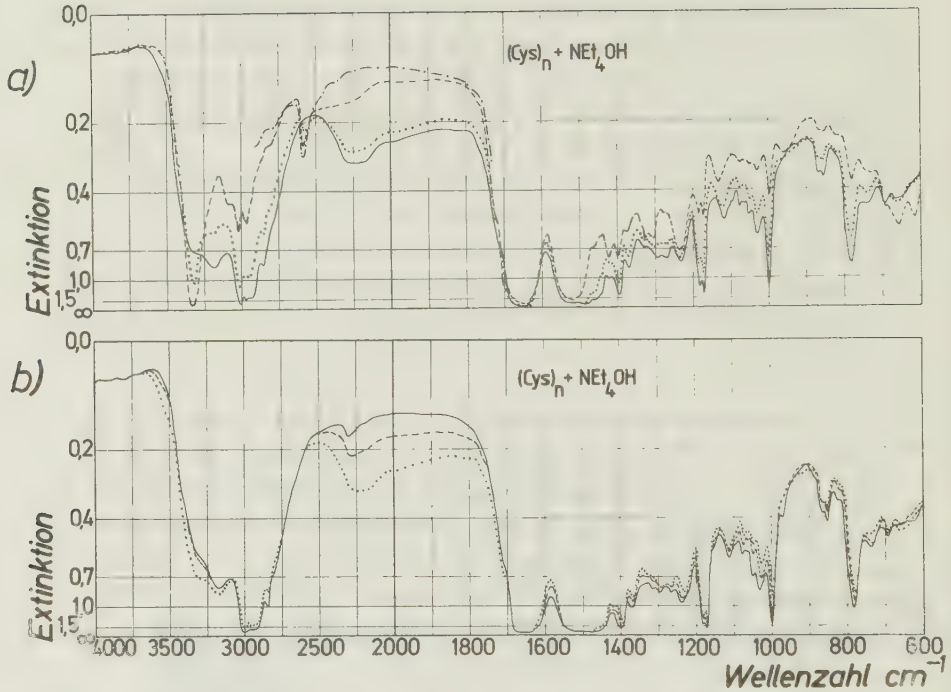


Abbildung 4.5. : Spektren von $(L\text{-}Cys)_n + NEt_4^+OH^-$ bei verschiedenen Gehalten an $(L\text{-}Cys^-NEt_4^+)_n$ in hoher Schichtdicke

Abbildung a) : (-.-.) : Freies $(L\text{-}Cys)_n$

(- - -): $(L\text{-}Cys)_n$ + 0,18 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

(. . .): $(L\text{-}Cys)_n$ + 0,50 Äquivalente $Net_4^+OH^-$

(——) : $(L\text{-}Cys)_n$ + 0,65 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

Abbildung b) : (. . .): $(L\text{-}Cys)_n$ + 0,65 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

(- - -): $(L\text{-}Cys)_n$ + 0,87 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

(——) : $(L\text{-}Cys)_n$ + 1,00 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

Demgegenüber wird im Bereich kleinerer Wellenzahlen keine entsprechende Veränderung des Untergrundes beobachtet.
Nach Überschreiten eines Maximalwertes der kontinuierlichen Absorption nimmt deren Intensität bei weiterer Basenzugabe wieder ab, um im 1:1-Gemisch völlig zu verschwinden.

In Abbildung 4.6. ist in durchgezogener Linie der beschriebene Verlauf der kontinuierlichen Absorption bei 1850 cm^{-1} in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Base gezeigt.
Der Maximalwert der kontinuierlichen Absorption erscheint dabei bei 0,65 Äquivalenten an zugesetzter Base, also deutlich jenseits des theoretisch zu erwartenden Wertes von 0,5 Äquivalenten.

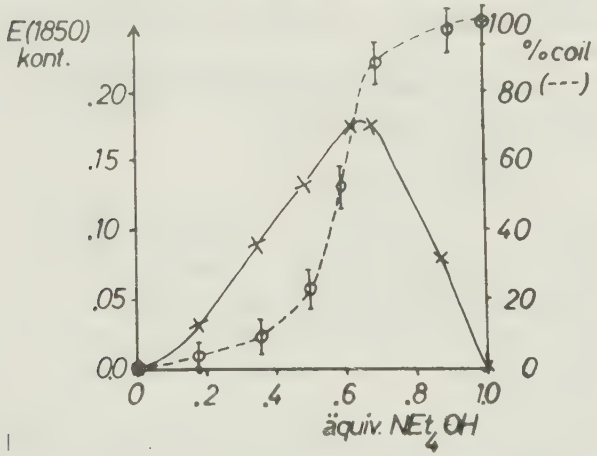


Abbildung 4.6. : (——) : Verlauf der kontinuierlichen Absorption im System $(L\text{-}Cys)_n$ + $NEt_4^+OH^-$ in Abhängigkeit von der Basenzugabe.
(- - -): Verlauf der Konformationsänderung von antiparalleler β-Struktur zur geknäuelten Anordnung in Abhängigkeit von der Basenzugabe

4.2.1.2. Zusammenhang zwischen kontinuierlicher Absorption und Anzahl an ausgebildeten Wasserstoffbrücken :

Wie bereits oben erwähnt, wird das Maximum der kontinuierlichen Absorption erst bei Zugabe von 0,65 Äquivalenten an Base und nicht, wie theoretisch zu erwarten wäre, exakt bei einem Wert von 0,5 erreicht.
Unter der Annahme, daß $E_{kont.}$ ein quantitatives Maß für die Anzahl

an ausgebildeten $(SHS)^-$-Brücken darstellt, muß angenommen werden, daß erst nach Zugabe von 0,65 Äquivalenten Base die maximale Anzahl an Brücken ausgebildet ist.

Dies setzt voraus, daß bei 0,5 Äquivalenten Base noch unverbrückte Spezies vorhanden sein müßte, was in der Existenz der SH-Valenzschwingung bei 2552 cm^{-1} zum Ausdruck kommen müßte.

Ein Blick auf das Teilspektrum eines derartigen Gemisches in Abbildung 4.7.c) zeigt tatsächlich noch eine merkliche Intensität dieser Bande bei 2552 cm^{-1}.

Die Abnahme der Intensität dieser Bande mit zunehmendem Basengehalt ist in den Abbildungen 4.7.a-d) gezeigt.

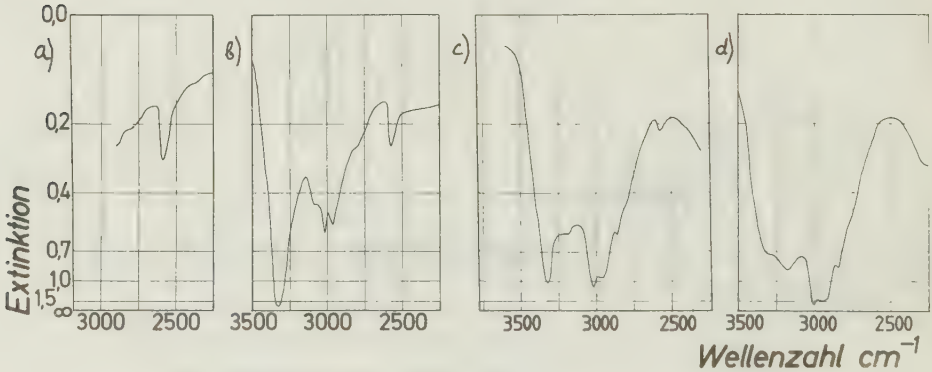


Abbildung 4.7. : Abnahme der Intensität der SH-Valenzschwingung bei Zugabe von $NEt_4^+OH^-$.

a) : Freies $(L\text{-}Cys)_n$

b) : $(L\text{-}Cys)_n$ + 0,18 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

c) : $(L\text{-}Cys)_n$ + 0,50 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

d) : $(L\text{-}Cys)_n$ + 1,00 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

In Abbildung 4.8. schließlich ist in durchgezogener Linie die Abhängigkeit der Intensität der ν_{SH} vom zugegebenen $NEt_4^+OH^-$-Gehalt aufgetragen und es ist ersichtlich, daß diese Schwingung erst bei einem Basengehalt von 0,65 Äquivalenten verschwindet.

Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem Maximalwert der kontinuierlichen Absorption.

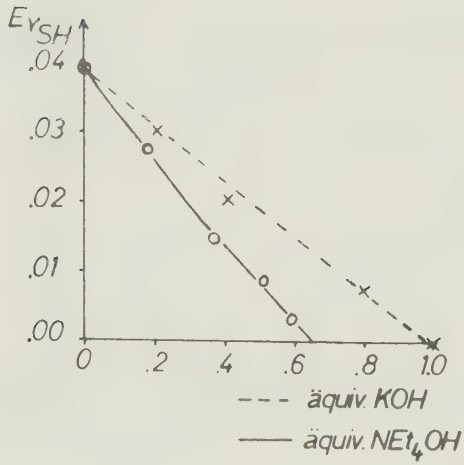


Abbildung 4.8. : Abnahme der Intensität der SH-Valenzschwingung in Abhängigkeit von der Basenzugabe bei
(——) Ausbildung von $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken,
(- - -)Nichtausbildung von $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken

Es läßt sich nun aus der Intensität der γ_{SH}-Schwingung der unverbrückten Spezies durch Vergleich mit dem entsprechenden Wert in einem $(L\text{-}Cys)_n$-Film gleicher Schichtdicke die Anzahl an unverbrückten Sulfhydrylgruppen ($n_{SH(frei)}$) bestimmen.
Hieraus und aus der Kenntnis zweier weiterer Parameter, nämlich der Gesamtzahl an vorhandenen SH-Gruppen (N), die der Einwaage entspricht, und der jeweiligen Menge an zugegebener Base (n) läßt sich entsprechend der im folgenden beschriebenen Beziehungen der Bruchteil an gebildetem $(SHS)^-$-Komplex errechnen.

Es gilt :

$$N - n_{SH(frei)} = n_{S^-(Salz)} + n_{SH(Komplex)} + n_{S^-(Komplex)}$$

Da gilt : $n_{SH(Komplex)} = n_{S^-(Komplex)}$, folgt :

$$N - n_{SH(frei)} = n_{S^-(Salz)} + 2\,n_{S^-(Komplex)} \qquad \text{(Gleichung I)}$$

Weiter gilt :

$$n_{S^-(Komplex)} + n_{S^-(Salz)} = n \qquad \text{(Gleichung II)}$$

Kombination von I und II liefert :

$$n_{S^-(Komplex)} = N - n_{SH(frei)} - n$$

Da jede im Komplex gebundene Gruppe $S^-_{(Komplex)}$ mit einer $SH_{(Komplex)}^-$gruppe verbrückt ist, gilt für die Gesamtzahl an verbrückten Cysteingruppen N' :

$$N' = 2\,n_{S^-(Komplex)} = 2\,(N - n_{SH(frei)} - n)$$

Der mittels dieser Beziehung mit Hilfe der aus den Spektren entnommenen Daten errechnete prozentuale Bruchteil $\frac{N'}{N}$ an $(SHS)^-$-verbrückter Spezies ist in Abbildung 4.9. (——) in Abhängigkeit vom Basengehalt aufgetragen.

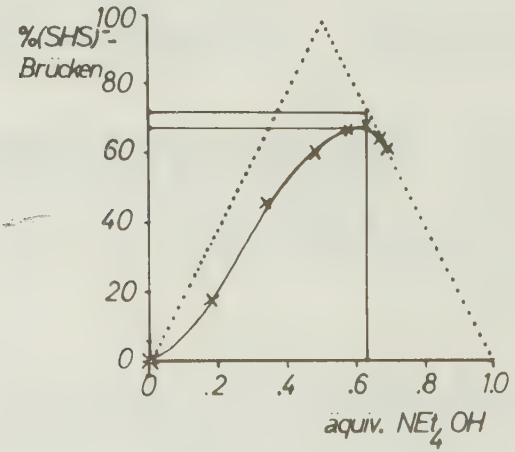


Abbildung 4.9. : (——) Mit der obig hergeleiteten Beziehung über die gemessene Intensität der SH-Valenzschwingung berechneter Prozentsatz an gebildeten $(SHS)^-$-Brücken
(. . .) Theoretisch zu erwartender Verlauf

Daneben ist punktiert der theoretische Verlauf der Brückenbildung eingezeichnet.
Deutlich zeigt sich auch hier an der Asymetrie des Kurvenverlaufes, daß der prozentuale Maximalwert an ausgebildeten Wasserstoffbrücken von etwa 67 % erst in der Gegend von 0,65 Äquivalenten an $NEt_4^+OH^-$ erreicht wird.
Dieser Wert liegt im Rahmen der Genauigkeit in guter Übereinstimmung mit dem bereits erwähnten Ergebnis, daß die kontinuierliche Absorption ihren Maximalwert erst bei 0,65 Äquivalenten Base erreicht.

Darüberhinaus zeigt ein Vergleich von Abbildung 4.6. und 4.8. den annähernd parallelen Verlauf der kontinuierlichen Absorption und der berechneten Menge an $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken.
Dies kann als Bestätigung dafür gelten, daß die Intensität von $E_{kont.}$ ein repräsentatives Maß für die Anzahl an ausgebildeten Wasserstoffbrücken darstellt.
Geringfügige Abweichungen der beiden Kurvenverläufe vor allem im Bereich des Maximums sind vermutlich der in diesem Bereich mit einem großen Fehler behafteten Auswertung der Intensität der γ_{SH}-Schwingung zuzuschreiben.

4.2.2. Zusammenhang zwischen Brückenbildung und Konformation :

4.2.2.1. Die hohe Kooperativität der Konformationsänderung :

Mit zunehmendem $NEt_4^+OH^-$-Gehalt der Filme und damit mit zunehmender Ausbildung an $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken findet im Rückgrat von $(L\text{-}Cys)_n$ eine Konformationsänderung von antiparalleler β-Struktur zu einem Knäuel statt.
Dies ist in den Spektren in Abbildung 4.5. und insbesondere in den Teilspektren von Abbildung 4.7.a-d) an einer Intensitätsabnahme der scharfen Amid-A-Bande bei 3286 cm^{-1} und am parallel dazu verlaufenden Erscheinen einer breiten Absorptionsbande mit Maximum bei 3150 cm^{-1} ersichtlich, die charakteristisch für Knäuelbildung ist.
Dies kann aus dem Vergleich mit dem Spektrum eines Filmes des Natrium-Salzes $(L\text{-}Cys^-Na^+)_n$, welches geknäuelt vorliegt, geschlossen werden.(Vergleiche Abbildung 3.22.i in Abschnitt 3.2.1.2.)

In Abbildung 4.10. ist der Verlauf der Konformationsänderung, der durch das Verhältnis der für antiparallele β-Struktur bzw. für Knäuel charakteristischen Amid-A-Banden repräsentiert wird, als gestrichelte Kurve in Abhängigkeit von der Menge an zugegebenem $NEt_4^+OH^-$ gezeigt.
Diese Kurve hat einen ausgeprägt sigmoiden, relativ steilen Verlauf, was auf hohe Kooperativität dieser Konformationsumwandlung hinweist.

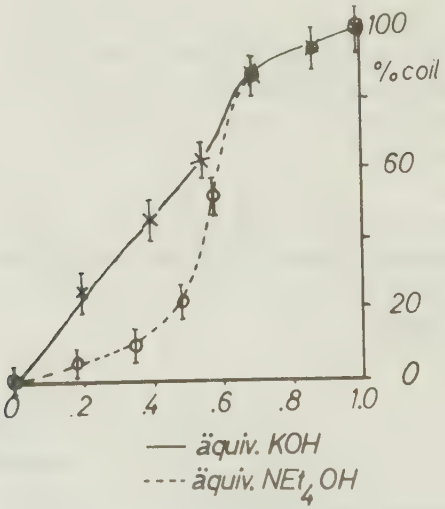


Abbildung 4.10. : Konformationsänderung von antiparalleler β-Struktur zum Knäuel in $(L\text{-Cys})_n$-Filmen bei Basenzugabe.
(——) : Verwendung von KOH (keine Brückenbildung)
(- - -): Verwendung von $NEt_4^+OH^-$ (Ausbildung von Brücken)

Zum Vergleich dazu ist als durchgezogene Linie in Abbildung 4.10. der Verlauf der Konformationsänderung zu sehen, wenn anstelle von $NEt_4^+OH^-$ Kaliumhydroxid zur Deprotonierung der SH-Gruppen verwendet wurde. In diesem Fall kommt es nicht zur Ausbildung von $(SHS)^-$-Brücken, was aus der proportionalen Abnahme der Intensität der SH-Valenzschwingung mit dem KOH-Gehalt in Spektren von $(L\text{-Cys})_n$+KOH-Filmen zu schließen ist.

Diese proportionale Abnahme der SH-Valenzschwingung ist in Abbildung 4.8. als gestrichelte Kurve eingezeichnet.
Aus Abbildung 4.10. wiederum ist deutlich zu erkennen, daß im letzteren Fall, d.h. bei Nichtexistenz von $(SHS)^-$-Brücken die Konformationsänderung von der antiparallelen β-Struktur zum Knäuel nur eine geringe Kooperativität aufweist.

Diesem Unterschied liegt vermutlich folgende Ursache zugrunde :
Während bei Zugabe von KOH zum $(L\text{-}Cys)_n$ Salzbildung eintritt und die damit parallel verlaufende Zunahme gleichnamiger negativer Ladungen in den Seitengruppen der Polyaminosäure zu wechselseitiger Abstoßung und damit bereits bei geringen KOH-Zugaben zur zunehmenden Zerstörung der geordneten β-Struktur führt, tritt bei Ausbildung von $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken eine Vernetzung der Seitengruppen ein, was zu einer Konservierung der geordneten β-Struktur über relativ weite Bereiche der Basenzugabe führt.
Hiermit erklärt sich der flache Kurvenverlauf zwischen 0 und 0,5 Äquivalenten an zugegebenem $NEt_4^+OH^-$.
Bei weiterer Zugabe von $NEt_4^+OH^-$ erfolgt dann zunehmende Zerstörung der Vernetzung durch Bildung von Sulfid-Anionen, deren wechselseitige Abstoßung den Übergang in eine ungeordnete Struktur induziert und damit zu der Aufsteilung des Verlaufes der gestrichelten Kurve in Abbildung 4.10. führt.

4.2.2.2. Der verschobene Maximalwert der kontinuierlichen Absorption :

Wie bereits in Abschnitt 4.2.1.1. erwähnt, wird das Maximum der kontinuierlichen Absorption und damit der Maximalwert an ausgebildeten $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken erst bei einer Zugabe von 0,65 Äquivalenten an $NEt_4^+OH^-$ erreicht.
Diese Verschiebung kann folgendermaßen gedeutet werden:

Ein Blick auf Abbildung 4.6., wo der Verlauf von $E_{kont.}$ und der der Konformationsumwandlung zusammengestellt sind, zeigt, daß der Maximalwert von $E_{kont.}$ in etwa mit dem Punkt der Konformationsänderung zusammenfällt, wo die deutliche Aufsteilung infolge beinahe vollständig erfolgter Umwandlung zum Knäuel beendet ist.
Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß erst die Ausbildung des ungeordneten Knäuels die Ausbildung aller $(SHS)^-$-Brücken ermöglicht,

während die bei Zugabe von 0,5 Äquivalenten $NEt_4^+OH^-$ noch zu etwa 75 % vorliegende β-Struktur aufgrund räumlicher Restriktionen nur die Ausbildung einer begrenzten Anzahl an Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen zulässt.
Daß eine geordnete Struktur die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen verhindern kann, kann aus dem in Abschn. 4.1. beschriebenen $(L\text{-Lys})_n$-Semiperchlorat-System ersehen werden, wo nur geordnete Struktur vorliegt,und dabei maximal lediglich 85 % Brükkenbildung erfolgt. (Vergleiche Abschnitt 4.1.2.)

Daß andererseits die geknäuelte Anordnung des Peptid-Rückgrates die - zumindest annähernd - vollständige Ausbildung von $(SHS)^-$-Brücken zwischen den Seitengruppen von $(L\text{-Cys})_n$ ermöglicht, ist aus Abbildung 4.9. ersichtlich, wo der aus der Intensität der γ_{SH}-Schwingung ermittelte Prozentsatz an ausgebildeten $(SHS)^-$-Brücken (durchgezogene Linie) zusammen mit dem theoretisch zu erwartendem Verlauf (punktiert) aufgetragen ist.

Ein Vergleich der beiden Kurven zeigt, daß bei etwa 0,65 Äquivalenten an zugegebener $NEt_4^+OH^-$-Base, wo, wie oben gezeigt, bereits überwiegend Knäuel vorliegt, der tatsächlich vorhandene Anteil an $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken im Rahmen der möglichen Genauigkeit mit dem theoretisch zu erwartenden Anteil identisch ist.
Dies wird in Abbildung 4.9. durch die beiden waagrechten Linien bei 65 bzw. 72 % Brückenbildung veranschaulicht.
Somit ermöglicht die Bildung des Knäuels die annähernd vollständige Ausbildung von $(SHS)^-$-Brücken zwischen den Seitengruppen.

4.2.3. Abhängigkeit der Brückenbildung vom Wassergehalt :

In Abbildung 4.11. ist das Teilspektrum eines $(L\text{-Cys})_n$-Filmes, der mit 0,5 Äquivalenten an $NEt_4^+OH^-$ versetzt worden war, im Bereich der SH-Valenzschwingung bei verschiedenen Hydratationsgraden gezeigt.
Deutlich ist mit zunehmender Hydratation des Filmes eine Intensitätszunahme der SH-Valenzschwingung bei 2552 cm^{-1} zu erkennen, was auf eine Zunahme des unverbrückten Anteils schließen läßt.
Mit Hilfe der in Abschnitt 4.2.1.2. abgeleiteten Beziehung wurde aus der jeweiligen Intensität der SH-Valenzschwingung für jede

Hydratationsstufe der prozentuale Anteil an verbrückter Spezies berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.12. zu sehen.

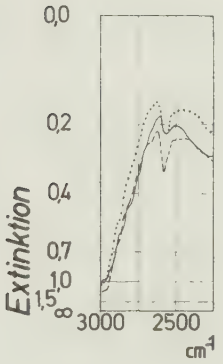


Abbildung 4.11. : Intensität der ν_{SH}-Schwingung eines mit 0,5 Äquivalenten $NEt_4^+OH^-$ versehenen $(L\text{-}Cys)_n$-Filmes in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad

(——) : Wasserfrei
(....) : 0,5 Moleküle Wasser pro Cysteinrest
(- - -): 2.5 Moleküle Wasser pro Cysteinrest

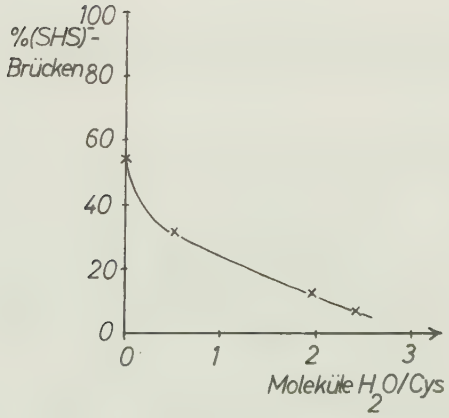


Abbildung 4.12. : Abhängigkeit des Prozentsatzes an ausgebildeten $(SHS)^-$-Brücken in einem mit 0,5 Äquivalenten $NEt_4^+OH^-$ versehenen $(L\text{-}Cys)_n$-Film vom Hydratationsgrad.

Die der jeweiligen definierten Luftfeuchtigkeit entsprechende, vom Film aufgenommene Wassermenge wurde dabei in einem Parallelversuch an einem anderen entsprechenden Film mit der Adsorptionswaage ermittelt.(Vergleiche hierzu Abschnitt 2.4.)

Abbildung 4.12. zeigt, daß die $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken sehr leicht durch Wassermoleküle aufgebrochen werden.
So sind bei Aufnahme von einem Molekül Wasser pro Seitengruppe bereits über die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Wasserstoffbrükken geöffnet, während bei zwei pro Seitengruppe angelagerten Wassermolekülen nur noch ca. 1/4 der Brücken existiert.

Extrapolation auf die Verhältnisse in wässriger Lösung ergibt, daß dort Wasserstoffbrücken von der Art $(SHS)^-$ nicht stabil sein können.

Dieses Ergebnis deutet auf eine wesentlich geringere Bindungsstärke der $(SHS)^-$-Brücken im Vergleich zu den bereits besprochenen $(NHN)^+$-Brücken hin, wo bei Anwesenheit von zwei Molekülen Wasser pro Seitengruppe noch ca. 50 % der ursprünglich vorhandenen Brücken existierten.(Vergleiche hierzu Abbildung 4.4.)

4.3. Poly-L-Glutaminsäure-Semi-tetraäthylammoniumsalz :

- Allgemeines :

In Analogie zu den Untersuchungen an $(L\text{-}Cys)_n$ wurden auch hier zur Erzeugung von homokonjugierten Wasserstoffbrücken vom Typ $\left(-C^{\diagup O}_{\diagdown O-H\cdots O}C-\right)^-$ zwischen den Seitengruppen Filme hoher Schichtdicke von $(L\text{-}Glu)_n$ mit variablem Gehalt an $NEt_4^+OH^-$ hergestellt.

4.3.1. Kriterien für die Ausbildung von $(OHO)^-$-Wasserstoffbrücken :

4.3.1.1.Auftreten einer kontinuierlichen Absorption :

In Abbildung 4.13. sind die Spektren von $(L\text{-}Glu)_n$-Filmen, die zusammen mit variablen Mengen an $NEt_4^+OH^-$ hergestellt worden waren, gezeigt.

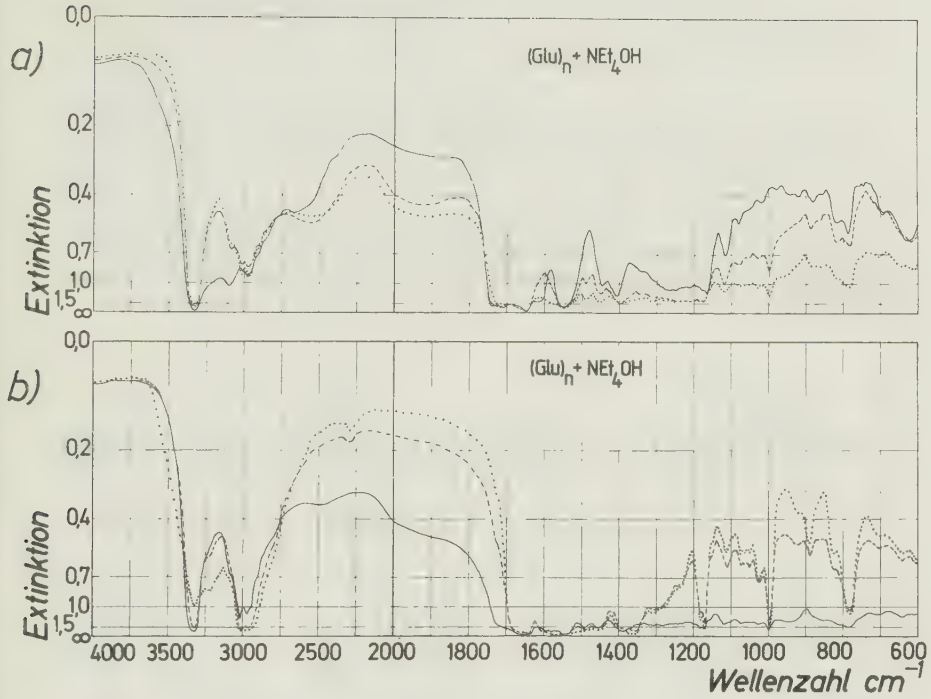


Abbildung 4.13. : Spektren von $(L\text{-}Glu)_n + NEt_4^+OH^-$ bei verschiedenen Gehalten an $(L\text{-}Glu^-NEt_4^+)_n$ in hoher Schichtdicke

Abbildung a) : (——) : Freie $(L\text{-}Glu)_n$

(- - -): $(L\text{-}Glu)_n$ +0,23 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

(. . .): $(L\text{-}Glu)_n$ +0,35 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

Abbildung b) : (——) : $(L\text{-}Glu)_n$ +0,50 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

(- - -): $(L\text{-}Glu)_n$ +0,81 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

(. . .): $(L\text{-}Glu)_n$ + 1,0 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

Deutlich ist mit ansteigender Zugabe von $NEt_4^+OH^-$ zunächst die Zunahme einer äußerst intensiven kontinuierlichen Absorption unterhalb etwa 3000 cm^{-1} über den ganzen restlichen Wellenzahlenbereich zu erkennen mit einem breiten Maximum zwischen etwa 1800 und 1000 cm^{-1}.

Derartig verlaufende Kontinua sind charakteristisch für die sehr kurzen und kräftigen $(OHO)^-$-Wasserstoffbrücken zwischen Carbonsäure-Carboxylat-Gruppen.(Lit.15)

Nach dem Überschreiten von 0,5 Äquivalenten nimmt, wie die Spektren in Abbildung 4.13. zeigen, die Intensität der kontinuierlichen Absorption stetig ab, um im reinen Tetraäthylammoniumsalz vollständig zu verschwinden.

Der Verlauf von $E_{kont.}$ bei 1100 cm^{-1} ist in Abbildung 4.14. in Abhängigkeit von der Basenzugabe als durchgezogene Linie eingezeichnet.

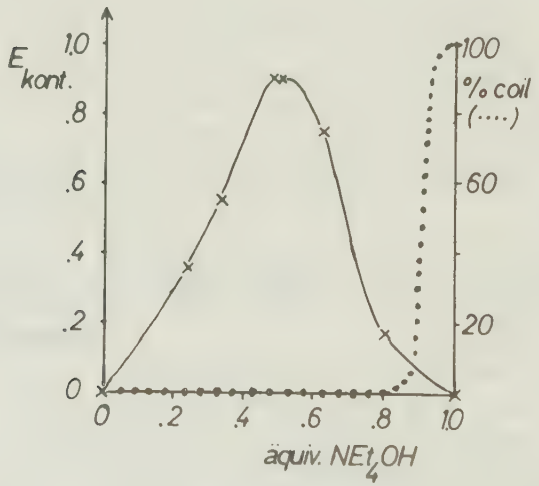


Abbildung 4.14. : (——) : Verlauf der kontinuierlichen Absorption bei 1100 cm^{-1} im System $(L\text{-}Glu)_n + NEt_4^+OH^-$ in Abhängigkeit von der Basenzugabe

(. . .): Verlauf der Konformationsumwandlung von α-Helix zum Knäuel bei Basenzugabe

Bei 0,5 Äquivalenten zugegebener Base befindet sich der Maximalwert von $E_{kont.}$.
Hieraus ist zu folgern, daß vollständige Brückenbildung eingetreten ist.
Die Intensität der kontinuierlichen Extinktion wurde bei 1100 cm^{-1}

betrachtet, weil, wie ein Blick auf das Spektrum von $(L\text{-}Glu)_n$ in Abbildung 4.13. zeigt, im Bereich höherer Wellenzahlen durch die in freier $(L\text{-}Glu)_n$ anwesenden Säuredimeren vom Typ $-C(=O)\cdots H\text{-}O-$ $-O\text{-}H\cdots O=C-$ der Untergrund angehoben wird.
Dieser Effekt wird durch Absorption der Dimeren bedingt, denn nach H.Wolff(Lit.53) erhalten zahlreiche Schwingungen in diesem Bereich durch Fermi-Resonanz mit der OH-Valenzschwingung der Dimeren Intensität, wobei sich die in Kristallen (Lit.53) beobachtete Bandenstruktur im amorphen Polmeren zu der beobachteten Untergrundanhebung zwischen 3200 und etwa 1800 cm^{-1} verschmiert.

4.3.1.2. Lage der antisymmetrischen Carboxylat-Schwingung ν_{as} :

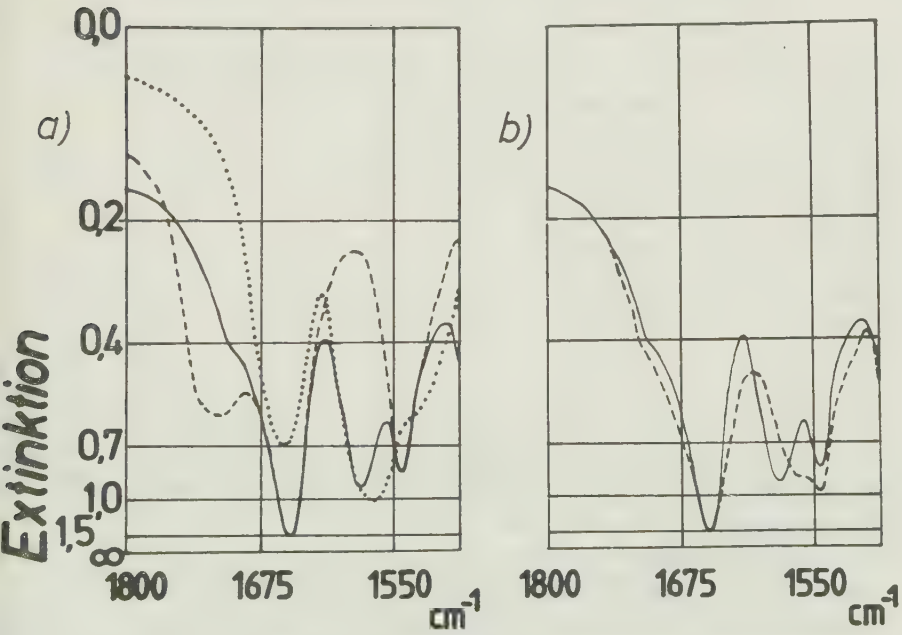


Abbildung 4.15.: Lage der Carbonsäure- bzw. Carboxylatschwingungen im $(L\text{-}Glu)_n$ - System

Abbildung a) : (——) : $(L\text{-}Glu)_n$ + 0,5 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

(- - -): $(L\text{-}Glu)_n$

(. . .): $(L\text{-}Glu^-K^+)_n$ (Kaliumsalz)

Abbildung b) : siehe nächste Seite !

Erklärung zu Abbildung 4.15. b) :
Verschiebung der ν_{as} -Schwingung im System $(L\text{-}Glu)_n$ + 0,5 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$ bei Hydratation.
(——) : Wasserfreier Film
(- - -): Nach Hydratation bei 57 % rel. Luftfeuchtigkeit

Die Lagen der Carbonsäure- bzw. Carboxylatschwingung des homokonjugierten Komplexes ($(L\text{-}Glu)_n$ + 0,5 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$) sind im Teilspektrum von Abbildung 4.15. a) in durchgezogener Linie im Vergleich zu den entsprechenden Banden von freier $(L\text{-}Glu)_n$ (- - -) und dem Kaliumsalz $(L\text{-}Glu^-K^+)_n$ (. . .) gezeigt.
Die genauen Bandenlagen sind in Tabelle 4.2. zusammengestellt.

Tabelle 4.2. :

Substanz	$\nu_{C=O}$ (cm^{-1})	ν_{as} (cm^{-1})
$(L\text{-}Glu)_n$	1715	-
$(L\text{-}Glu^-K^+)_n$	-	1575
Homokonjugat $(OHO)^-$ wasserfrei	1705 sh	1584
Homokonjugat $(OHO)^-$ hydratisiert	1715	1570

Die beobachteten Werte für $(L\text{-}Glu)_n$ und $(L\text{-}Glu^-K^+)_n$ zeigen gute Übereinstimmung mit Literaturdaten.(Lit.5, 7, 66)
Die Tatsache, daß im homokonjugierten Komplex sowohl $\nu_{C=O}$ wie auch ν_{as} zu beobachten sind, zeigt, daß in dieser Wasserstoffbrücke noch ein Doppelminimumpotential vorliegt.
Damit unterscheiden sich diese Brücken von den von Hadži und Novack untersuchten Säure-Salz-Kombinationen (Lit.15), bei denen gezeigt wurde, daß breite, symmetrische Einfachminima vorliegen.
Der Umstand, daß ν_{as} nach geringfügig höheren Wellenzahlen und $\nu_{C=O}$ nach niedrigeren Wellenzahlen verschoben sind als im Kaliumsalz bzw. in der freien Säure, beruht auf dem Einfluß des Brückenprotons auf die Carbonsäure- bzw. Carboxylatgruppe.

Hiernach ist der Wall im Doppelminimum sehr niedrig.

Tabelle 4.2. bzw. Abbildung 4.15. b) zeigen, daß sich bei Hydratation (gestricheltes Spektrum) die γ_{as}-Schwingung zu ungefähr derjenigen Lage verschiebt, bei der sie im Kaliumsalz beobachtet wird. Dies, obwohl die Brücken - wie später gezeigt werden wird - nicht aufgehen.
Man kann annehmen, daß die Wassermoleküle sich mit dem zweiten Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe verbrücken. Dadurch läßt sich die erwähnte Verschiebung von $\gamma_{C=O}$, bzw γ_{as} erklären.

4.3.2. Einfluß der Hydratation auf die $(OHO)^-$-Brücken :

In Abbildung 4.16. ist neben dem Spektrum eines mit 0,5 Äquivalenten $NEt_4^+OH^-$ versehenen, getrockneten $(L\text{-}Glu)_n$-Filmes das Spektrum des gleichen Filmes nach Hydratation bei 57 % rel. Luftfeuchtigkeit gezeigt.(gestrichelt in Abbildung 4.16.)

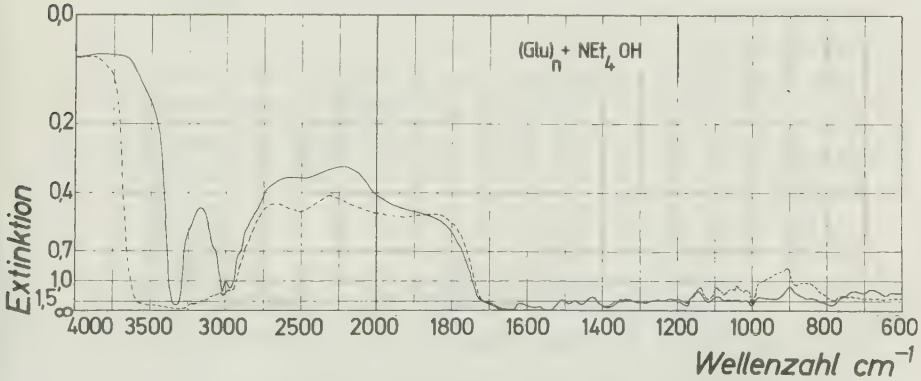


Abbildung 4.16. : Einfluß der Hydratation auf $E_{kont.}$ eines mit 0,5 Äquivalenten $NEt_4^+OH^-$ versehenen $(L\text{-}Glu)_n$-Filmes
(——) : Wasserfreies System
(- - -): Nach Hydratation bei 57 % rel. Luftfeuchtigkeit

Ein Vergleich beider Spektren zeigt, daß die Intensität von $E_{kont.}$ im Bereich zwischen 1800 und 1000 cm^{-1}, wo der Maximalwert der kontinuierlichen Absorption liegt, nahezu unverändert ist.
Hieraus ist zu schließen, daß durch die Anlagerung von Wasser die $(OHO)^-$-Wasserstoffbrücken überwiegend erhalten bleiben.
Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den sehr geringen O-O-Abständen analoger derartiger Brücken in Kristallen homokonjugierter dimerer Komplexe von Aminosäure-Assoziaten, wo Abstände zwischen 2,43 und 2,58 A gefunden wurden.(Lit. 63, 64)

Darüberhinaus wurde mit Hilfe von kinetischen Messungen von anderen Autoren gezeigt, daß homokonjugierte$(OHO)^-$-Komplexe in wässriger Lösung Assoziationskonstanten besitzen, die in der Größenordnung von eins sind. (Lit.65)

Andererseits zeigt der Vergleich der beiden Spektren in Abbildung 4.16., daß nur im Wellenzahlenbereich zwischen 1700 und etwa 1100 cm^{-1} das Ausmaß von $E_{kont.}$ bei Hydratation unverändert bleibt, während bei niedrigeren Wellenzahlen im Falle der Hydratisierung die Intensität von $E_{kont.}$ abnimmt. Diese Tendenz wird im gestrichelt gezeichneten Spektrum noch etwas verdeckt durch die Torsionsschwingung des Wassers bei etwa 700 cm^{-1}.
Dieser Effekt läßt sich mit einer Vergrößerung des O-O-Abstandes in der $(OHO)^-$-Brücke bei Wasseranlagerung erklären, denn die Theorie zeigt (Lit.29), daß sich mit zunehmender Brückenlänge das Maximum der kontinuierlichen Absorption nach höheren Wellenzahlen verschiebt.

4.3.3. Konformationsänderung des Rückgrates :

Abbildung 4.17.a) zeigt den Bereich der Amid-A-Bande für verschiedene Gemische von $(L\text{-Glu})_n$ mit $NEt_4^+OH^-$ in Filmen geringer Schichtdicke. Daneben zeigt Abbildung 4.17.b) gestrichelt die Amid-A-Bande eines reinen $(L\text{-Glu})_n$-Filmes in α-helikaler Konformation und in durchgezogener Linie das Verschwinden dieser Bande zugunsten einer breiten, nach kleineren Wellenzahlen verschobenen Absorption bei Knäuel-Bildung im Kaliumsalz $(L\text{-}Glu^-K^+)_n$.
Daß freie $(L\text{-Glu})_n$ helikal vorliegt, geht aus der Lage der weiteren Amid-Banden hervor (Tabelle 4.3.) und wurde überdies bereits in

anderen Arbeiten sowohl für Filme als auch für Lösungen nachgewiesen.(Lit.5, 33, 59, 60, 61, 62)

Tabelle 4.3. :

Substanz	Amid A(cm^{-1})	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})	Konformation
$(L\text{-}Glu)_n$	3290	1652	1548	α- Helix
$(L\text{-}Glu)_n$ + 0,5 Äquivalente an $NEt_4^+OH^-$	3292	1650	1546	α- Helix
$(L\text{-}Glu)_n$ + 1,0 Äquivalente an $NEt_4^+OH^-$	3180(breite Bande)	1654	verdeckt durch $\gamma_{as}(CO_2^-)$	Knäuel

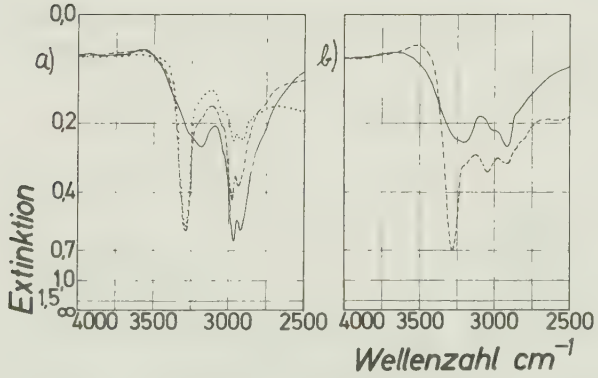


Abbildung 4.17. : Teilspektrum im Bereich der Amid-A-Bande zur Ermittlung der Konformation von $(L\text{-}Glu)_n$ + $NEt_4^+OH^-$-Assoziat-Filmen.

Abbildung a) (. . .) : $(L\text{-}Glu)_n$ + 0,35 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$
(- - -) : $(L\text{-}Glu)_n$ + 0,80 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$
(——) : $(L\text{-}Glu)_n$ + 1,00 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

Abbildung b) (- - -) : Zum Vergleich $(L\text{-}Glu)_n$
(——) : Zum Vergleich $(L\text{-}Glu^-K^+)_n$

Ein Vergleich der fast identischen Lagen der in Tabelle 4.3. aufgeführten Amid-Banden von $(L\text{-Glu})_n$ und einem 2:1-Gemisch von $(L\text{-Glu})_n$ und $NEt_4^+OH^-$, in dem, wie oben gezeigt, vollständig $(OHO)^-$-Brücken ausgebildet sind, zeigt, daß auch im $(OHO)^-$-Assoziat α-helikale Konformation vorliegt.

Darüberhinaus weist die Unveränderlichkeit der Lage und Intensität der α-Helix-spezifischen Amid-A-Bande in den punktiert und gestrichelt gezeichneten Spektren in Abbildung 4.17.a) darauf hin, daß die Helixkonformation bis zu einem $NEt_4^+OH^-$-Gehalt von 0,8 Äquivalenten Base unverändert bleibt.

Bei Zugabe von 1,0 Äquivalenten an Base erfolgt schließlich, wie aus der starken Abnahme der scharfen Amid-A-Bande bei 3292 cm^{-1} und dem Auftauchen einer breiten Absorptionsbande bei etwa 3180 cm^{-1} gefolgert werden kann ((----) in Abbildung 4.17.a)), eine Umwandlung in eine geknäuelte Struktur.

Dies ist ersichtlich durch Vergleich der Amid-A-Bande mit dem in Abbildung 4.17.b) durchgezogen gezeichneten Bandenverlauf des ebenfalls geknäuelten Kaliumsalzes $(L\text{-Glu}^-K^+)_n$.

In Abbildung 4.14. ist der beschriebene Verlauf der Konformationsänderung in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an $NEt_4^+OH^-$ punktiert eingetragen.

4.3.4. Zusammenhang zwischen der Ausbildung der $(OHO)^-$-Brücken und der Konformation des Rückgrates :

Abbildung 4.14. zeigt anhand des Zusammenhanges zwischen der kontinuierlichen Absorption bei 1100 cm^{-1} und der Konformation, daß die in freien $(L\text{-Glu})_n$-Filmen vorliegende α-Helix vereinbar ist mit der Ausbildung von $(OHO)^-$-Wasserstoffbrücken zwischen den γ-Carboxylgruppen.

Es wird keine mit einer Konformationsumwandlung korellierte Verschiebung des Maximalwertes der kontinuierlichen Absorption beobachtet, wie dies im $(L\text{-Cys})_n$ + $NEt_4^+OH^-$-System der Fall war. Vielmehr erscheint der bei 1100 cm^{-1} gemessene Maximalwert von $E_{kont.}$ exakt bei einem Wert von 0,5 Äquivalenten an zugesetzter Base.

Dies läßt auf eine von konformativen Zwängen ungehinderte Ausbil-

dung von Wasserstoffbrücken schließen.
Dies konnte überprüft werden an einem Kalottenmodell, wo sich zeigte, daß die Ausbildung von Wasserstoffbrücken intrahelikal, d.h., zwischen den Seitengruppen der gleichen Helix in geordneter Weise möglich ist.

Erst nachdem der Anteil an $(OHO)^-$-Brücken durch vermehrte Basenzugabe annähernd auf Null abgesunken ist - ersichtlich am Verschwinden der kontinuierlichen Absorption - erfolgt, wie Abbildung 4.14. zeigt, der Übergang zum Knäuel unter quantitativer Ausbildung des Tetraäthyl-ammoniumsalzes.
Die Knäuelbildung wird verständlich unter Berücksichtigung der wechselseitigen Abstoßung gleichsinnig geladener Carboxylatgruppen im Salz.

4.4. Poly-L-Asparaginsäure-Semi-tetraäthylammoniumsalz :

4.4.1. Nichtexistenz von $(OHO)^-$-Wasserstoffbrücken :

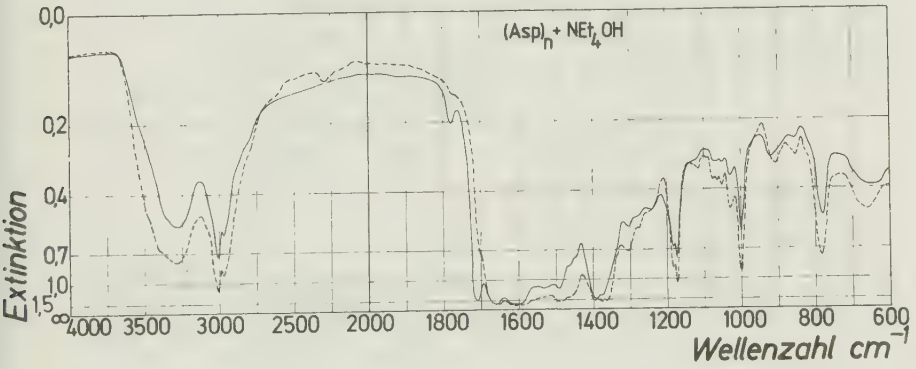


Abbildung 4.18. : Nichtexistenz einer kontinuierlichen Absorption im System $(L\text{-Asp})_n$ + NEt_4OH .
(———) : $(L\text{-Asp})_n$ + 0,5 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$
(- - -): $(L\text{-Asp})_n$ + 1,0 Äquivalente $NEt_4^+OH^-$

In Abbildung 4.18. ist in ausgezogener Linie das Spektrum eines wasserfreien $(L\text{-Asp})_n$-Filmes , der mit 0,5 Äquivalenten an $NEt_4^+OH^-$ versehen wurde, gezeigt.
Zum Vergleich ist gestrichelt das Spektrum des Tetraäthylammonium-salzes $(L\text{-Asp}^-NEt_4^+)_n$ eingezeichnet.
Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt, daß im Falle des mit 0,5 Äquivalenten Base versehenen Filmes keine kontinuierliche Absorption beobachtet wird, wie dies im Gegensatz dazu für das analoge $(L\text{-Glu})_n$-System der Fall war,und in Abschnitt 4.3. gezeigt wurde.

4.4.2. Gründe für die Nichtexistenz von $(OHO)^-$-Wasserstoffbrücken :

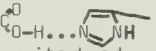
Offensichtlich ist für die Nichtexistenz von $(OHO)^-$-Wasserstoffbrücken im Falle der $(L\text{-Asp})_n$ die im Vergleich zu $(L\text{-Glu})_n$ um eine CH_2-Gruppe verkürzte Seitenkette verantwortlich, welche die zur Ausbildung von $(OHO)^-$-Brücken erforderlichen sterischen Bedingungen nicht mehr erfüllen kann. Möglicherweise lassen auch die voluminösen Tetraalkylammonium-Ionen eine hinreichende Annäherung der Seitengruppen nicht zu.
Hiernach erwies sich dieses Polmersystem zur Untersuchung von $(OHO)^-$-Brücken zwischen Asparaginsäure-Resten als ungeeignet.
Entsprechende Untersuchungen könnten aber möglicherweise an monomerer, endgruppengeschützter Asparaginsäure durchgeführt werden.

5. Bedeutung der beschriebenen Ergebnisse an Polyaminosäuresystemen für Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinseitengruppen biologischer Systeme: - Aspekte -

Bereits einleitend wurde auf die Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen bei den postulierten Mechanismen von Enzym-katalysierten Reaktionen hingewiesen.

Im folgenden sollen exemplarisch einige Schlüsse erläutert werden, die aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse auf Enzymmechanismen gezogen werden können.

5.1. Lage des Protontransfergleichgewichtes :

Die am System $(L\text{-Glu})_n+(L\text{-His})_n$ gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß die Wasserstoffbrücke vom Typ Glu-  His mit 75 % Protontransfer im wasserfreien Zustand weitgehend symmetrisch ist. Unter der Annahme, daß der Ersatz von Glu gegen Asp den Wert des Protontransfers nur unwesentlich verändert (Lit.2), können einige Schlüsse auf den von Blow postulierten (Lit.89,90,133) charge-relay-Mechanismus im aktiven Zentrum von Chymotrypsin gezogen werden, der in Abbildung 5.1. dargestelit ist.

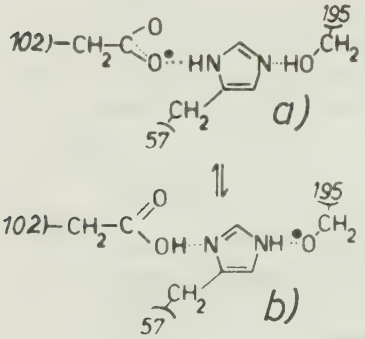


Abbildung 5.1. :

Charge-relay-Mechanismus von Chymotrypsin (nach Lit.91)

Dort wird ein Wasserstoffbrücken-Bindungssystem zwischen dem Ser 195, dem His 57 und dem Aspartatrest 102 postuliert, welches die hohe Nucleophilie des Ser 195- Restes gegenüber dem Substrat dadurch erklären soll, (Lit.92) daß eine Protonenübertragung auf die Carb-

oxylatgruppe 102 eintritt, entsprechend der Grenzstruktur b) in Abbildung 5.1.

Dieser Mechanismus wird plausibel unter Zugrundelegung des Ergebnisses, daß die Wasserstoffbrücke zwischen dem His-57 und der Asp-102-Gruppe mit 75 % Protontransfer noch annähernd symmetrisch und damit leicht polarisierbar ist.

Bei Betrachtung von Grenzstruktur b), welche die hohe Nucleophilie des Serin-Restes plausibel macht, ergibt sich für die Wechselwirkung zwischen Serin- und Histidinrest eine Wasserstoffbrücke vom Typ Alkoholat + Imidazol bzw, Alkohol + Imidazolatanion.
Ein Vergleich der pK_a-Werte von primären Alkoholen und Imidazol (16 bzw. 14,2 lt. Lit.93) läßt dabei auf ein etwas tieferes Potentialminimum des Protons am Sauerstoff schließen, d.h., das Proton sollte vorwiegend am Sauerstoff gebunden sein.
Andererseits zeigten aber bereits frühere IR-Untersuchungen am Modellsystem Alkoholat + Imidazol das Auftreten kontinuierlicher Absorption(Lit.6), was auf noch beträchtliche Polarisierbarkeit auch derartiger Wasserstoffbrücken hinweist.
Damit ist offenkundig, daß das gesamte charge-relay-System im Chymotrypsin leicht polarisierbar ist,und bereits eine geringfügige Umgebungsveränderung eine Potentialänderung und damit eine Protonenshift ermöglichen kann.
Eine derartige Potentialänderung könnte z.B. durch die Anwesenheit eines electrophilen Substrates verursacht werden, welches die Elektronendichte am Alkoholsauerstoff erniedrigt und damit dessen Acidität erhöht.

Die am System $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Cys})_n$ gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß die Wasserstoffbrücke zwischen der SH-Gruppe und der ε-Aminogruppe beider Aminosäuren symmetrisch und damit leicht polarisierbar ist. (50 % Protontransfer im trockenen Zustand)

Hieraus ist zu folgern, daß bei Enzymen, in deren katalytischen Schritten reversible Protonenverschiebungen zwischen Cystein- und Baseresten formuliert werden, als basischer Partner primär Lysin-Reste in Frage kommen.

Arginin-Reste erweisen sich, wie die Ergebnisse am System $(L\text{-Cys})_n$ + N-α-Benzoyl-argininamid und Methylguanidin zeigten, als zu stark basisch (jeweils 100 % Protontransfer), um Protonenverschiebungen ohne hohen Energieaufwand zu ermöglichen.

Histidin-Reste andererseits besitzen eine zu geringe Basizität, um Protontransfer zu ermöglichen, wie die Ergebnisse an den Systemen $(L\text{-Cys})_n$ + N-Methylimidazol und Propylmercaptan + N-Methylimidazol zeigten.

Beispiele für entsprechende Enzyme sind die Proteine Fettsäure-Synthetase und Alkoholdehydrogenase.(Lit.94, 95)

Die katalytischen Schritte der Alkoholdehydrogenase sind in Abbildung 5.2. gezeigt.

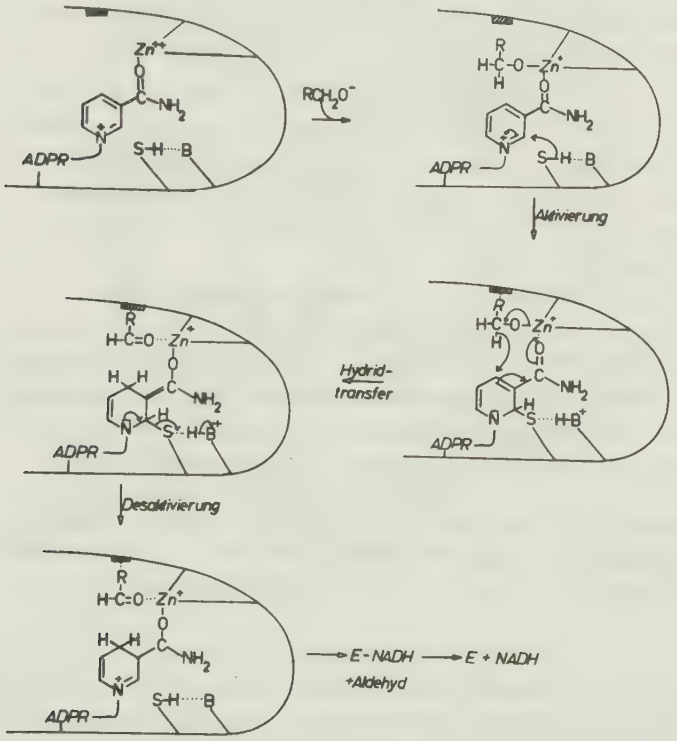


Abbildung 5.2. : Katalytische Schritte der Alkoholdehydrogenase (nach Lit.95) (Vorschlag)

5.2. Einfluß von Wasser auf die Dissoziation von Wasserstoffbrücken :

In der vorliegenden Arbeit wurde an verschiedenen Brückensystemen gezeigt, daß bereits die Anwesenheit von wenigen Wassermolekülen pro ausgebildeter Wasserstoffbrücke gravierende Änderungen hinsichtlich Protontransfer einerseits und Dissoziation der Wasserstoffbrücken andererseits hervorruft.

Insbesondere der Einfluß hinsichtlich der Dissoziation läßt auf die große Bedeutung der bei Enzymen realisierten hydrophoben Taschen schließen, in denen nach Anlagerung des Substrates entweder unter völligem Wasserausschluß oder bei Anwesenheit einer genau definierten Anzahl von Wassermolekülen, die Reaktionsschritte im aktiven Zentrum ablaufen.

So wäre z.B. bei Anwesenheit auch nur weniger Wassermoleküle der für die Alkoholdehydrogenase in Abbildung 5.2. gezeigte Mechanismus(Lit.95) über eine leicht polarisierbare Wasserstoffbrücke vom Typ S-H...B $\rightleftharpoons$ $S^-...HB^+$ nicht möglich, da derartige Wasserstoffbrücken unter solchen Bedingungen bereits weitgehend aufgebrochen sind.
Dies zeigten die Untersuchungen an der S-H...N $\rightleftharpoons$ $S^-...H-N^+$ - Wasserstoffbrücke zwischen $(L\text{-}Lys)_n$ und $(L\text{-}Cys)_n$, wo bereits die Anwesenheit von 2-3 Molekülen Wasser pro ausgebildeter Brücke erstens zu einer starken Verschiebung des Protontransfergleichgewichtes auf die Seite der polaren Grenzstruktur führte,und zweitens weitgehende Dissoziation in hydratisierte ionische Spezies eintrat.

In ähnlicher Weise ist der für die Fettsäuresynthetase postulierte Mechanismus (Lit.94), in dem ebenfalls eine S-H...B - Wasserstoffbrücke auftaucht,nur unter Ausschluß von Wasser denkbar.

Als plausibelster Mechanismus des lichtinduzierten, aktiven Protonentransportes durch die Purpurmembran von Halobakterien erscheint eine Protonenverschiebung längs der zwischen den Seitengruppen des Membranproteins Bacteriorhodopsin ausgebildeten Wasserstoffbrücken nach Absorption eines Lichtquants und der dadurch herbeigeführten Existenz hochenergetischer Anregungszustände.(Lit.96, 97, 98)

Ein Strukturvorschlag für Bakteriorhodopsin ist in Abbildung 5.3. gezeigt.(Lit.99, 104)

Abbildung 5.3. : Strukturvorschlag für Bakteriorhodopsin
(nach Lit. 99, 104) (Ausschnitt)

Aus der überwiegenden Anwesenheit von Tyrosin, Asparaginsäure, Lysin und Arginin im Inneren des Proteins sollten neben homokonjugierten Systemen vor allem folgende Wasserstoffbrücken auftreten :

Tyr-O-H-O-Tyr zwischen Tyrosin-Resten, O-H...N $\rightleftharpoons$ O^-...H-N^+ zwischen Tyrosin und Lysin bzw. Arginin, und -$C(=O)-O^-$...H-N^+ zwischen Asparaginsäure und Lysin bzw. Arginin.

Da alle drei Typen von Wasserstoffbrücken, wie anhand der Modellsysteme $(L\text{-Tyr})_n$ bzw. Copoly(L-Tyr, L-Lys·HBr)$_n$, $(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenole und $(L\text{-Glu})_n$+$(L\text{-Lys})_n$ gezeigt wurde, bei Anwesenheit bereits weniger Wassermoleküle pro ausgebildeter Wasserstoffbrücke überwiegend dissoziieren, erscheint eine hydrophobe Umgebung zur Aufrechterhaltung dieser Wasserstoffbrücken und damit der Protonenleitung erforderlich.
Genau dies ist hier der Fall, denn Bakteriorhodopsin besitzt im Inneren überwiegend hydrophobe Aminosäuren, während an der Oberfläche vorwiegend polare Aminosäuren lokalisiert zu sein scheinen. (Lit.100)

5.3. Konformationsänderungen :

Die meisten nativen Proteine zeigen einen ausgeprägt kooperativen, pH-abhängigen reversiblen Übergang von der nativen Konformation zu einer zufällig geknäuelten Anordnung.(Lit.101)
Als Beispiel sei hier nur die Ribonuclease erwähnt, bei welcher der Übergang zwischen $pH_{3.5}$ und $pH_{4.5}$ auftritt. (Lit.101)
Mit derartigen Denaturierungs- Renaturierungsvorgängen geht naturgemäß eine Veränderung des Wasserstoffbrückenmusters zwischen den Protein-Seitengruppen einher.

Als Modellsystem für das Studium des Zusammenhanges zwischen Sekundärstruktur und Wasserstoffbrückenmuster zwischen den Seitengruppen kann das System $(L\text{-Cys})_n$+ $NEt_4^+OH^-$ dienen, wo sich - wie gezeigt - Wasserstoffbrücken vom Typ$(S\text{-H}...S)^-$ ausbilden.
Es wurde gezeigt, daß das über $(SHS)^-$-Brücken verknüpfte System infolge der Konservierung der geordneten Struktur durch die ausgebildeten Brücken einen hohen Grad an Kooperativität bei der Kon-

formationsänderung von der β-Struktur zum Knäuel aufweist, während der entsprechende Übergang bei KOH-Zugabe, d.h., bei Nichtausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen eine wesentlich geringere Kooperativität besitzt, worauf der Vergleich der Steigungen der Umwandlungskurven hinweist.(Vergleiche Abbildung 4.10.)

Hieraus kann gefolgert werden, daß auch in nativen Proteinen das Ausmaß der Kooperativität von pH-abhängigen Denaturierungs-Renaturierungsvorgängen stark vom Verbrückungsgrat der Protein-Seitengruppen abhängen könnte.
Hierauf weist auch das Ergebnis am über $(OHO)^-$-Brücken verknüpften $(L\text{-Glu})_n$-System hin, wo ebenfalls ein stark kooperativer Konformationsübergang zwischen einer geordneten Struktur (α-Helix) und einem Knäuel beobachtet wird. Es wurde gezeigt, daß auch in diesem Fall die geordnete Struktur durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen konserviert wird.

Zusammenfassung der Ergebnisse :

Es wurden mit Hilfe der IR-Spektroskopie von Filmen verschiedener Polyaminosäuren unterschiedliche Typen von Wasserstoffbrücken untersucht, die sich zwischen den Seitengruppen ausbilden können. Hierunter fallen sowohl strukturunsymmetrische Brücken als auch solche vom symmetrischen Typ.

Eine Übersicht der behandelten Systeme zeigt die Tabelle auf Seite 133, wo die mit(Lit.) versehenen Kombinationen bereits in früheren Arbeiten untersucht worden waren.

Dabei erfolgte die Auswertung der Spektren vor allem hinsichtlich der folgenden Gesichtspunkte :

1) Brückenbildung im wasserfreien System :

Sowohl in den 1:1-Polymer-Monomer-, als auch in den entsprechenden Polymer-Polymer-Systemen vom strukturunsymmetrischen Typ erfolgt - zumindest nahezu - quantitative Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Dies zeigte die Auswertung von für Brückenbildung sensitiven Banden. Auch im Falle des statistischen Copolymeren Copoly-$(L\text{-Lys},L\text{-Tyr})_n$ erfolgt nahezu quantitative Brückenbildung.

2) Protontransfer :

Die Untersuchungen am System $(L\text{-Glu})_n+(L\text{-His})_n$ zeigen , daß die Wasserstoffbrücke zwischen dem γ-Carbonsäurerest und dem Histidinrest mit 75 % Protontransfer annähernd symmetrisch ist.
Dieser Befund macht den charge-relay-Mechanismus im Chymotrypsin plausibel.
Weiterhin erweist sich die Wasserstoffbrücke zwischen der SH-Gruppe von Cystein und der ε-Aminogruppe von Lysin - wie die Ergebnisse am System $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Cys})_n$ zeigen - mit 50 % Protontransfer als symmetrisch. Hieraus ist zu folgern, daß bei Enzymen mit Cystein-Base-Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum primär Lysin-Reste als geeignete Partner in Frage kommen.

a) Strukturunsymmetrische Wasserstoffbrücken in Polymer-Monomer-Systemen :

System	Brückentyp	$\Delta pK_{a(sym)}$	Konf.änderung	Moleküle H_2O/ Brücke	Hydrat.abhäng.-keit des $\Delta pK_{a(sym)}$	Öffnung d.Brücken bei Hydratation	
$(L\text{-Lys})_n$+Chlorphenole	O-H...N	1,9	-	1-4(je nach System)	ja	ja	
$(L\text{-Cys})_n$+N-Basen	S-H...N	2,0	β - coil	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	
$(L\text{-His})_n$+Carbonsäuren	O-H...N	2,8	Helix- coil	variabel	ja	keine	(Lit.11)
$(L\text{-Glu})_n$+N-Basen	O-H...N	2,3	-	1-3	ja	keine	(Lit.5)

b) Strukturunsymmetrische Wasserstoffbrücken in Polymer-Polymer-Systemen :

System	Brückentyp	PT(%)	überwiegende Konformation	Moleküle H_2O/ Brücke	Hydrat.abhäng.-keit des PT	Öffnung d.Brücken bei Hydratation
$(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Tyr})_n$	O-H...N	10	Helix + β-Strukt.x)	1-2	keine	keine
copoly$(L\text{-Lys, L-Tyr})_n$	O-H...N	10-20	β -Strukt.x)	1-2	keine	keine
$(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Glu})_n$	O-H...N	100	β -Strukt.x)	3-4	keine,da 100 %	ja
$(L\text{-Lys})_n$+$(L\text{-Cys})_n$	S-H...N	50	Helix (n_{Lys}=2286)xx) Helix + β-Strukt. (n_{Lys}=192) xx)	2-3	ja, 80-90 %	ja
$(L\text{-Glu})_n$+$(L\text{-His})_n$	O-H...N	75	β-Strukt. xx)	1-2	ja, 90 %	keine

Anmerkung :

x) :Keine Änderung bezüglich der isolierten Polymere

xx) :Änderung bezüglich der isolierten Polymere

c) Struktursymmetrische Brücken in Polymer-Polymer-Systemen :

System	Brückentyp	Grad d.Ausbildung d. Brücken (% d.Theorie)	Konformat.änderung abhängig v.Brückenbildung	Öffnung d.Brücken bei Hydratation($3H_2O$)
$(L\text{-LysHLys})_n$	$(NHN)^+$	85	keine	ja, zu 55 %
$(L\text{-CysHCys})_n$	$(SHS)^-$	67	β-Strukt.-coil	ja, zu 100 %
$(L\text{-GluHGlu})_n$	$(OHO)^-$	100	Helix-coil	nein
$(L\text{-AspHAsp})_n$	$(OHO)^-$	keine Brückenbild.	-	-
$(L\text{-HisHHis})_n$	$(NHN)^+$	nicht untersucht	Helix-coil	nicht untersucht (Lit.20)

3) Einfluß der Hydratation :

- Bei allen strukturunsymmetrischen Wasserstoffbrücken mit Ausnahme von $(L\text{-Tyr})_n+(L\text{-Lys})_n$ und copoly$(L\text{-Tyr},L\text{-Lys})_n$ zeigt sich eine Zunahme des Protontransfers bei Hydratation.
Die beiden erwähnten Ausnahmen lassen sich durch das geringe Ausmaß der Hydratation in diesen Fällen erklären.

- Neben dem oben erwähnten Effekt führt bereits geringe Hydratation bei manchen Systemen zu zumindest teilweiser Dissoziation der Wasserstoffbrücken. Dies ist für die Kombinationen $(L\text{-Lys})_n$+ + Chlorphenole, $(L\text{-Glu})_n+(L\text{-Lys})_n$ und $(L\text{-Cys})_n+(L\text{-Lys})_n$ der Fall.

Ein derartiges Verhalten wird auch für die struktursymmetrischen Brücken mit geringer Bindungsstärke, nämlich $(NHN)^+$ und $(SHS)^-$ beobachtet, während die kräftigeren $(OHO)^-$-Brücken zwischen Carbonsäureresten auch bei Anlagerung von ca. 3 Molekülen Wasser pro ausgebildeter Wasserstoffbrücke noch nicht geöffnet werden. Allerdings kann in diesem Fall auf eine Vergrößerung der Bindungslänge geschlossen werden.
Daß für die Systeme $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Tyr})_n$, copoly$(L\text{-Tyr},L\text{-Lys})_n$ und $(L\text{-Glu})_n+(L\text{-His})_n$ keine hydratationsabhängige Dissoziation beobachtet wird, mag auf die geringe Hydratation in diesen Systemen zurückzuführen sein.

Das Aufbrechen der Brücken durch Wasseranlagerung weist auf die enorme Bedeutung von hydrophoben Bereichen für die Katalyseschritte von Enzymen hin. Dies wird an den Beispielen von Alkoholdehydrogenase, Fettsäuresynthetase und Bakteriorhodopsin gezeigt.

- Das Ausmaß der hydratationsabhängigen Dissoziation der struktursymmetrischen Brücken bei einem herausgegriffenen Wert von 3 H_2O pro ausgebildeter Wasserstoffbrücke von ca. 100 % für $(SHS)^-$, 55 % für $(NHN)^+$ und 0 % für $(OHO)^-$ läßt auf eine Abnahme der Bindungsstärke in der folgenden Reihe schließen :
$(OHO)^- > (NHN)^+ > (SHS)^-$.

4) Konformation :

- Der Vergleich der Polymer-Monomer-Kombination $(L\text{-Cys})_n$+Propyl-

amin mit dem Polymer-Polymer-Addukt $(L\text{-Cys})_n+(L\text{-Lys})_n$ zeigt, daß im letzteren System kräftigere S-H...N - Wasserstoffbrücken mit einem höheren Wert des Protontransfers realisiert sind, vermutlich weil im Polymer-Polymer-Addukt die sterischen Verhältnisse zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke optimaler Geometrie günstiger sind.

Ein derartiger Effekt tritt naturgemäß bei der kräftigeren O-H...N-Brücke zwischen Lysin und Tyrosin zunehmend in den Hintergrund und wird deshalb nicht beobachtet, wie der Vergleich der Systeme $(L\text{-Lys})_n$+ + Chlorphenole und $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Tyr})_n$ zeigt.

- Die Untersuchungen an 1:1-Gemischen von $(L\text{-Glu})_n+(L\text{-His})_n$ und insbesondere von $(L\text{-Cys})_n+(L\text{-Lys})_n$ zeigen, daß in manchen Systemen das Polymere mit der offensichtlich dominierenden Konformation beim Partner die Ausbildung ebendieser Konformation induziert, obwohl letzterer im freien Zustand eine andere Konformation bevorzugt.

Im Gegensatz hierzu liegt im System $(L\text{-Lys})_n+(L\text{-Tyr})_n$ ein Konformationsgemisch der isolierten Partner vor, wobei aber dennoch die vollständige Brückenbildung gewährleistet ist.

- Am System $(L\text{-Cys})_n+NEt_4^+OH^-$ ist ersichtlich, daß die Ausbildung von $(SHS)^-$-Wasserstoffbrücken die Kooperativität der Konformationsänderung β – Knäuel wesentlich erhöht. Ein ähnlich kooperativer Übergang zwischen α-Helix und Knäuel, der im Zusammenhang mit dem Verschwinden von $(OHO)^-$-Brücken steht, wird bei $(L\text{-Glu})_n+NEt_4^+OH^-$ beobachtet. Dieses Verhalten wird als mögliches Modell für entsprechende pH-abhängige geordnet – ungeordnet-Übergänge von Proteinen gedeutet.

- Die Protontransferkurve des Systems $(L\text{-Cys})_n$+N-Basen zeigt im Vergleich zu derjenigen von $(L\text{-Lys})_n$ mit Chlorphenolen einen wesentlich steileren Verlauf. Diese Aufsteilung ist der Kopplung des Protontransfers mit der kooperativen Konformationsänderung des $(L\text{-Cys})_n$-Rückgrates von β-Struktur zum Knäuel zuzuschreiben.

Literaturverzeichnis

(1) S.N. Vinogradov: Biochim. et Biophys. Acta 214, 6-27 (1970)

(2) A.N.Glazer in:"The Proteins", ed. by H.Neurath, R.L.Hill, Academic Press, New York, 1976 , Band II, Seite 2ff.

(3) C.Brisette, C.Sandorfy: Can.J.Chem. 38, 34-44 (1960)

(4) B.Vogt, Universität München, Phys.Chem. Institut, persönliche Mitteilung

(5) R.Lindemann, G.Zundel: Biopolymers 16,2407-2418 (1977)

(6) D.Schiöberg, G.Zundel: JCS, Faraday II, 69,771-781 (1973)

(7) H.Lenormant, A.Bondras, E.R.Blout: J.Am.Chem.Soc.80, 6191-6195 (1958)

(8) R.Lindemann: Dissertation, Universität München, 1976

(9) Yu.N.Chirgadze, A.M.Ovsepyan: Biopolymers, 11, 2179-2186 (1972)

(10) A.J.Hopfinger: Intermolecular Interactions and Biomolecular Organisation, John Wiley, New York, 1977

(11) R.Lindemann, G.Zundel: Biopolymers, 17,1285-1304 (1978)

(12) R.Lindemann, G.Zundel: JCS, Faraday II, 73,788-803 (1977)

(13) R.Lindemann, G.Zundel: JCS, Faraday II, 68,979-990 (1972)

(14) D.Hadži: Pure Appl.Chem. 11,435-453 (1965)

(15) D.Hadži, S.Bratos in: The Hydrogen Bond, Recent Developments in Theory and Experiments, ed. by P.Schuster, G.Zundel, C.Sandorfy, North Holland , Amsterdam 1976, Bd.II, Seite 565 ff.

(16) M.F.Claydon, N.Sheppard: Chem.Comm. (1969), 1431-1433

(17) M.Nagasawa, A.Holtzer: J.Am.Chem.Soc. 86, 538-543 (1964)

(18) A.Patchornik, A.Berger, E.Katchalski: J.Am.Chem.Soc. 79, 5227-5230 (1957)

(19) D.Hadži, N.Kobilarow: J.Chem.Soc. A, 439- 445 (1966)

(20) J.Muehlinghaus, G.Zundel: Biopolymers 10, 711-719 (1971)

(21) A.C.M.Paiva, L.Juliano: J.Am.Chem.Soc. 98, 7645-7648 (1976)

(22) Handbook of Chemistry and Physics,58 th. Edition (1977-78), CRC-Press, West Palm Beach, USA

(23) Handbook of Proton Ionization Heats, ed. J.J.Christenesn, L.D. Hansen, R.M.Izatt, A.Wiley Interscience Publication, N.Y. 1976

(24) Ionization Constants of Acids and Bases, ed. A.Albert, E.P. Serjeant, Methuen u.Co., London 1962

(25) A.Hayd, E.G.Weidemann, Universität München, unveröffentlichte Ergebnisse

(26) A.L.Lehninger: Biochemistry, Worth, New York 1970
(27) L.J. Bellamy in : Organic Sulfur Compounds, ed. by N.Kharasch, Pergamon Press, Oxford, London (1960), Band I, Seite 47 - 56.
(28) W.Gordy, S.C.Stanford: J.Am.Chem.Soc. 62, 497-505 (1940)
(29) A.Hayd, E.G.Weidemann, G.Zundel: J.Chem.Phys. 70, 86-91 (1979)
(30) R.Srinivasan, K.K.Chacko in: Conformation of Biopolymers, ed. by G.N.Ramachandran, Academic Press,London, New York (1967) Band II, Seite 608 ff.
(31) Yu.N.Chirgadze, E.V.Brazhnikov, N.A.Nevskaya: J.Mol.Biol. 102, 781-792 (1976)
(32) E.V.Brazhnikov, Yu.N.Chirgadze: J.Mol.Biol. 122, 127-135 (1978)
(33) P.Doty, A.Wada, J.Tsi Yang: J.Polym.Sci. 23, 851-861 (1957)
(34) Y.W.Tseng, J.Tsi Yang: Biopolymers 16, 921-935 (1977)
(35) S.Beychok, G.D.Fasman: Biochemistry 3, 1675-1678 (1964)
(36) A.Garnier, L.Tosi: Biopolymers, 17, 199-211 (1978)
(37) C.S.Wright, R.A.Alden: Nature, 221, 235-241 (1969)
(38) E.Katchalski,N.Shavit, H.Eisenberg: J.Polym.Sci. 13, 69-84 (1954)
(39) I.N.Hsu,L.T.J.Delbaere: Nature 266, 140-145 (1977)
(40) " " : " 267, 808-813 (1977)
(41) P.M.Colman, J.N.Jansonius, B.W.Matthews: J.Mol.Biol. 70, 701-724 (1972)
(42) J.L.Koenig, P.L.Sutton: Biopolymers 9, 1229-1237 (1970)
(43) M.Tsuboi et.al.: Spectrochim.Acta 12, 253-261 (1958)
(44) P.V.Huong, M.Conzi, J.Lascombe: J.Chim.Phys. 64, 1056-1058 (1967)
(45) D.Cook: Can.J.Chem. 42, 2721-2727 (1964)
(46) " : " 42, 2292-2299 (1964)
(47) C.Belin, J.Potier: J.Chim.Phys. 73, 117-121 (1976)
(48) " " : " 73, 122-127 (1976)
(49) M.F.Perutz: Spektr.d.Wissenschaft, 2, 19-34 (1979)
(50) G.Zundel in: The Hydrogen Bond, Recent Developments in Theory and Experiments, ed.by P.Schuster, G.Zundel, C.Sandorfy, North Holland, Amsterdam, New York, Oxford (1976), Band II, Seite 683-766.
(51) G.Zundel, J.Muehlinghaus: Z.für Naturforschung, 26b, 546-555(1971)
(52) B.Brzezinski, G.Zundel: JCS, Faraday II, 72, 2127-2137 (1976)
(53) H.Wolff, H.Müller, E.Wolff: J.Chem.Phys. 64, 2192-2196 (1976)
(54) A.Quick, D.J.Williams: Can.J.Chem. 54, 2465-2469 (1976a)
(55) J.S.Fruton: Adv. Enzymol. 44, 1-36 (1976) , ed. by A.Meister, J.Wiley, New York

(56) E.M.Bradbury, L.Brown, A.R.Downie, A.Elliot, R.D.B.Fraser, W.E.Hanby: J.Mol.Biol. 5, 230-247 (1962)
(57) T.Glowiak, L.Sobczyk, E.Grech: Chem.Pys.Lett. 36, 106-107 (1975)
(58) "Hydratation and Intermolecular Interaction, Infrared Investigations with Polyelectrolyte Membranes", ed.by G.Zundel, Academic Press, New York 1969 und Mir, Moskau 1972, Seite 35 ff.
(59) H.Lenormant, A.Bondras, E.R.Blout: J.Am.Chem.Soc. 80, 6191-6195 (1958)
(60) L.Goldstein, E.Katchalski: Bull.Res.Counc.of Israel, 9A, 138 (1960)
(61) E.Lizuka, J.T.Yang: Biochemistry 4, 1249-1257 (1965)
(62) G.D.Fasman in: "Poly- α -Aminoacids", ed.by G.D.Fasman, Dekker, New York 1967, Seite 512 ff.
(63) L.Golic, W.C.Hamilton: Acta Cryst. B28, 1265-1271 (1972)
(64) J.L.Derissen, H.J.Endermann, A.F.Peerdeman: Acta Cryst. B24, 1349-1354 (1968)
(65) E.S.Hand, W.P.Jencks: J.Am.Chem.Soc. 97, 6221-6230 (1975)
(66) W.Sessler: Diplomarbeit Universität München 1969
(67) K.D.Kopple, "Peptides and Amino-Acids", W.A.Benjamin Inc., New York, Amsterdam 1966
(68) A.Berger, E.Katchalski: J.Am.Chem.Soc. 78, 4483-4488 (1956)
(69) J.Murray, N.Gordon: J.Am.Chem.Soc. 57, 110-111 (1935)
(70) L.J.Bellamy in:"The Infrared Spectra of Complex Moleculs", ed.by L.J.Bellamy, Chapman and Hall, London 1975, Seite 107ff.u. 277ff.
(71) J.C.Evans: Spectrochim.Acta 16, 1382-1392 (1960)
(72) R.Janoschek, E.G.Weidemann, G.Zundel: JCS, Faraday II, 69, 505-520 (1973)
(73) G.Zundel, A.Nagyrevi: J.Phys.Chem. 82, 685-689 (1978)
(74) S.N.Vinogradov: Biopolymers ,18, 1559-1561 (1979), No.6
(75) M.M.Breuer, M.G.Kennerly: J.Colloid Interface Sci. 37, 124-131 (1971)
(76) J.Oakes: JCS,Faraday I, 72, 216-227 (1976)
(77) Z.Pawlak, J.Magonski: J.Sol.Chem. (1979) in press
(78) M.Schreiber, A.Koll, L.Sobczyk: Bull.Acyd.Polon.Sci.Ser.Sci.Chim. 26, 651 (1978)
(79) J.Jadzyn, J.Malecki: Acta Phys.Polon. A41, 599 (1972)
(80) S.Ikeda, A.Kito, T.Imae: J.Colloid Interface Sci. 48, 256-262 (1974)
(81) M.B.Senior,S.L.H.Gorrell, E.Hamori: Biopolymers 10, 2387-2404 (1971)
(82) E.J.Ambrose, A.Elliot: Proc.Roy.Soc. A205, 47-60 (1951)
(83) " " " " A208, 75-90 (1951)

(84) B.Brzezinski, M.Szafran: Polish.J.Chem. 52, 131-140 (1978)
(85) E.Grech, Z.Malarski, L.Sobczyk: Polish J.Chem. 52, 1833-1835 (1978)
(86) Z.Dega-Szafran: Bull.Acad.Polon.Sci.Ser.Sci.Chim. 27, No.4 (1979)
(87) Z.Pawlak, L.Sobczyk: Adv.Molec.Relax.Interact.Processes, Vol.5, Seite 99 ff.,Elsevier Publ.Co.,Amsterdam 1973
(88) T.Glowiak, L.Sobczyk, E.Grech: Chem.Phys.Lett. 34, 292-293 (1975)
(89) D.M.Blow, J.J.Birktoft, B.S.Hartley: Nature 221, 337-340 (1969)
(90) P.B.Sigler, D.M.Blow, B.W.Matthews, R.Henderson: J.Mol.Biol. 35, 143-164 (1968)
(91) G.Zundel: J.Mol.Struct. 45, 55-73 (1978)
(92) F.Schneider: Angew.Chem. 90, 616-624 (1978)
(93) G.Yagil: Tetrahedron, 23, 2855-2861 (1967)
(94) G.B.Kresze, L.Steber, D.Oesterhelt, F.Lynen: Eur.J.Biochem. 79, 191-199 (1977)
(95) B.R.Rabin et al. in: Enzymes and Isoenzymes; Structure, Properties and Function; Academic Press, London, New York 1970, Seite 36 ff.
(96) M.A.Marcus, A.Lewis: Biochemistry 17, 4722-4735 (1978)
(97) A.Lewis, M.A.Marcus, B.Ehrenberg, H.Crespi: Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 75, 4642-4646 (1978)
(98) G.Eyring, R.Mathies: Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76, 33-37 (1979)
(99) Yu.A.Ovchinnikov: Eur.J.Biochem. 94, 321-336 (1979)
(100) J.Bridgen, I.Walker: Biochemistry, 15, 792-796 (1976)
(101) C.B.Anfinsen: Angew.Chem. 85, 1065-1074 (1973)
(102) J.D.Watson, F.H.C.Crick: Nature 171, 737-738 (1953)
(103) L.Pauling, R.B.Corey: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 37, 729-740 (1951)
(104) Yu.A.Ovchinnikov, N.G.Abdulaev, M.Yu. Feigina, A.V.Kislev, N.A.Lobanov: FEBS Lett. 100, 219-224 (1979)
(105) G.C.K.Roberts, E.A.Dennis et al.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 62, 1151-1158 (1969)
(106) H.Rüterjans, H.Witzel: Eur.J.Biochem. 9, 118-127 (1969)
(107) E.Holler: Angew.Chem. 90, 682-690 (1978)
(108) P.A.Hollmann, L.C.Allen: Chem.Rev. 72, 283-303 (1972)
(109) S.N.Vinogradov,R.H.Linnell : "Hydrogen Bonding", van Nostrand Reinold Company, New York 1971
(110) W.A.P.Luck in : "The Hydrogen Bond", Recent Developments in Theory and Experiments, ed.by P.Schuster, G.Zundel, C.Sandorfy, North Holland, Amsterdam, New York, Oxford (1976), Band II, Seite 536 ff.

(111) P.Kebarle, S.K.Searles, A.Zolla: J.Am.Chem.Soc. 89, 6393-6399 (1967)
(112) R.Janoschek, E.G.Weidemann, H.Pfeiffer, G.Zundel: J.Am.Chem.Soc. 94, 2387-2396 (1972)
(113) E.G.Weidemann, G.Zundel: Z.für Nat.forschung 25a, 627-634 (1970)
(114) B.Brzezinski, G.Zundel: Chem.Phys.Lett. 44, 521-525 (1976)
(115) R.Janoschek, A.Hayd, G.Weidemann, M.Leuchs, G.Zundel: JCS,Faraday II, 74, 1238-1245 (1978)
(116) Z.Bohak, E.Katchalski: Biochemistry 2, 228-237 (1963)
(117) P.Doty, R.D.Lundberg: Chemistry 43, 213-222 (1957)
(118) C.H.Bamford, A.Elliot, W.E.Hanby: "Synthetic Polypeptides", Academic Press, New York 1956, Seite 345 ff.
(119) K.P.Hoffmann, G.Zundel: Rev.of Sci.Instr. 42, 1727 (1971)
(120) D.Balasubramanian: Biopolymers 12, 1639-1650 (1973)
(121) J.Kurtz, W.Harrington: J.Mol.Biol. 17, 440-455 (1966)
(122) A.Elliot: Proc.Roy.Soc. A221, 104-114 (1954)
(123) T.Miyazawa, E.R.Blout: J.Am.Chem.Soc. 83, 712-719 (1961)
(124) T.Miyazawa in:"Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins", ed. by M.Stahmann, Madison,The University of Wisconsin Press 1962, Seite 201 ff.
(125) E.Katchalski, M.Sela, H.I.Silmann, A.Berger in:"Polyamino Acids As Protein Models" in "The Proteins",Band II, ed.by H.Neurath, Academic Press, New York, 1964 , Seite 405-602
(126) J.A.Schellmann, C.Schellmann: ebenda, Seite 1-137
(127) T.Suzuki: Bull.Chem.Soc.Japan, 35, 540 (1962)
(128) E.Hanby,J.Waley, Watson: J.Chem.Soc. 3239-3249 (1950)
(129) M.F.Perutz: Nature 167, 1053-1054 (1951)
(130) T.Miyazawa: J.Mol.Spectroscopy 4, 168-172 (1960)
(131) E.Kuratani: J.Chem.Soc.Japan 73, 758 (1952)
(132) P.Huyskens, Th.Zeegers-Huyskens: J.Chim.Phys. 61, 81-86 (1964)
(133) D.M.Blow: Acc. Chem. Res. 9, 145-152 (1976)

Lebenslauf

Name :	Wolfgang Kristof
Geburtsdatum :	19. 8. 1949
Geburtsort :	München
Staats-angehörigkeit :	deutsch
Familienstand :	ledig
Eltern :	Alfons Kristof, Archivar, Anna Kristof, geb.Hitzelsperger
Schulbildung :	1955-1960 Volksschule in Ottobrunn 1960-1969 Besuch des Theresien-Gymnasiums in München (altsprachlicher Zweig) 1969 Abitur

Ableistung des Wehrdienstes 1969-1970

Universität :	1970-1975 Chemiestudium an der Universität München
	1975 Diplomprüfung in Chemie
	1975-1976 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut f.Phys.Chemie
	1976-1979 Anfertigung der Dissertation am Institut f.Phys.Chemie der Universität München bei Prof. Dr. G. Zundel.